

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1]

A reagent for immunoassay which is a reagent for immunoassay for detecting autoantibody to RB1 gene product, and is characterized by coming to combine protein (P) which becomes considering an amino acid sequence included in an amino acid sequence of an array number (1) as a constitutional unit, and an insoluble in water nature carrier (B).

[Claim 2]

The reagent for immunoassay according to claim 1 which is an amino acid sequence included in an adenovirus E1A coupling region where an amino acid sequence is expressed with an amino acid sequence of an array number (2).

[Claim 3]

The reagent according to claim 1 or 2 and a reagent kit for immunoassay containing an anti human immunoglobulin antibody.

[Claim 4]

The reagent kit according to claim 3 to which it comes to carry out the sign of the anti human immunoglobulin antibody with a labeled compound.

[Claim 5]

The reagent kit according to claim 4 whose labeled compound is an enzyme.

[Claim 6]

An immunoassay method including a process of judging existence of autoantibody to RB1 gene product in a sample by being an immunoassay method of autoantibody to RB1 gene product, applying the reagent kit according to claim 4 or 5 to a sandwich technique, and quantifying a labeled compound.

[Claim 7]

The immunoassay method according to claim 6 by chemiluminescence enzyme immunoassay.

[Claim 8]

A process characterized by comprising the following of judging existence of autoantibody to RB1 gene product in a sample.

The amount [ as opposed to / using blood as a sample / this sample ] of anti human immunoglobulins.

A reference value set up from the amount of anti human immunoglobulins to two or more healthy persons' blood is compared.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

#### [Field of the Invention]

##### [0001]

This invention relates to the immunoassay method of the autoantibody to the reagent for immunoassay for detecting the autoantibody to RB1 gene product, the reagent kit for immunoassay containing this, and anti-RB1 gene product.

#### [Background of the Invention]

##### [0002]

RB1 gene is an antioncogene which encodes protein (following and RB1 gene product) with a molecular weight of about 110 kilodalton. In various human cancers, it is known that deletion, point mutation, etc. will happen to RB1 gene at high frequency (nonpatent literatures 1 and 2). On the other hand, in victims of lung cancer, it is accepted with western blotting that the autoantibody which reacts to RB1 gene product into blood appears (nonpatent literature 3).

##### [0003]

[Nonpatent literature 1] Science (Science), 243,937 pages, 1989

[Nonpatent literature 2] Oncogene (Oncogene), 8 or 1913 pages, 1993

[Nonpatent literature 3] International Journal OBU One koro G (Int.J.Oncology), 19 or 1035 pages, 2001

#### [Description of the Invention]

#### [Problem(s) to be Solved by the Invention]

##### [0004]

Conventionally, as for the autoantibody to RB1 gene product, the existence was checked by western blotting. Western blotting needs operation of complicated and prolonged [, such as electrophoresis or blotting, ], and when measuring many samples, especially the adaptation to clinical diagnostic etc. is difficult. As for western blotting, there is a problem in sensitivity, reproducibility, etc. That is, the purpose of this invention is to provide the reagent for immunoassay which can detect the autoantibody to RB1 gene product with reproducibility sufficient simple at high sensitivity.

#### [Means for Solving the Problem]

##### [0005]

To achieve the above objects, as a result of inquiring wholeheartedly, this invention persons found out that autoantibody to RB1 gene product was detectable with reproducibility sufficient simple at high sensitivity, and reached this invention. That is, the feature of an immunoassay reagent of this invention is a reagent for immunoassay for detecting autoantibody to RB1 gene product, and makes a gist a point of coming to combine protein which becomes considering an amino acid sequence included in an amino acid sequence of an array number (1) as a constitutional unit, and an insoluble in water nature carrier.

#### [Effect of the Invention]

##### [0006]

The reagent for immunoassay for detecting the autoantibody to RB1 gene product of this invention has few nonspecific reactions, and they are extremely excellent in sensitivity and

singularity. That is, to the sample of the healthy person in whom the difference of the measured value of the sample from the healthy person who does not hold autoantibody, and the measured value of the sample from the cancer patient who holds autoantibody does not hold autoantibody greatly (high sensitivity) enough, since there are very few nonspecific reactions, highly precise measurement can be performed. Since it can measure simple, many samples can be measured easily in a short time. Namely, the reagent for immunoassay of this invention can detect the autoantibody to RB1 gene product with the simple and sufficient reappearance by high sensitivity. Therefore, if the measuring reagent, measuring reagent kit, and measuring method of this invention are used, diagnosis of very quick and exact cancer can be performed.

[Best Mode of Carrying Out the Invention]

[0007]

RB1 gene product which is an expression product from RB1 gene is about 110-kilodalton protein [polypeptide which consists of an amino acid sequence of an array number (1)].

[0008]

As protein (P) which makes a constitutional unit the amino acid sequence included in the amino acid sequence of an array number (1), the protein (P1, P2) etc. which make a constitutional unit some amino acid sequences of an array number (1) or an array number (1) can be used.

Preparation is difficult for the protein (P1) which makes a constitutional unit the amino acid sequence of an array number (1), and it is preferred to use the protein (P2) which makes a constitutional unit some amino acid sequences of an array number (1).

[0009]

As protein (P2), the amino acid sequence of an array number (1) 20–600 amino acid, The protein etc. which become considering the fragment (amino acid sequence) preferably divided 50–500 pieces so that it might become 100–360 pieces still more preferably as a constitutional unit are contained, For example, the protein etc. which make a constitutional unit the amino acid sequence of the array number chosen from an array number (2), a (adenovirus E1A coupling region), and the group that consists of (3) – (19) are mentioned. Among these An array number (2), (3), (5), (6), (7), The protein which becomes considering the amino acid sequence of (9), (11), (12), (13), (14), (15), (17), or (18) as a constitutional unit is preferred, It is the protein which becomes still more preferably considering the amino acid sequence of an array number (2), (3), (5), (6), (7), (9), (15), (17), or (18) as a constitutional unit.

[0010]

When the number of proteinic (P) amino acid is the protein which comprises 20–100 pieces (preferably 20–50 pieces), protein (P), It may comprise only an amino acid sequence and the amino terminal and/or the C terminal may be further embellished with biotin, thioglycolic acid, the amino acid (cystein, lysine, tyrosine, glutamic acid, aspartic acid, etc.) used as a linker, etc. The amino terminal may be acetylated by an acetic anhydride or N-acetylimidazole, The C terminal may be amidated by a water-soluble carbodiimide (for example, 1-ethyl-3-dimethylaminopropylcarbodiimide hydrochloride) or isooxazolium (for example, N-methyl-5-phenyliso oxazolium fluoroborate). These ornamentation can also be combined and used. the case where the amino terminal and/or the C terminal are embellished with amino acid — the number of this amino acid — per an amino terminal or C terminal, and 1–5 — desirable — further — desirable — 1–3 — it is 1–2 especially preferably. the case where the amino terminal and/or the C terminal are embellished with biotin and/or thioglycolic acid — the number of biotin or thioglycolic acid — per one molecule of protein (P), and 1–5 — desirable — further — desirable — 1–3 — it is 1–2 especially preferably. Being embellished with biotin or thioglycolic acid is [ among these ] preferred, and it is that the amino terminal and/or the C terminal are embellished with biotin still more preferably from viewpoints of the simple nature in the case of combining protein (P) and an insoluble in water nature carrier (B), etc.

[0011]

When the number of proteinic (P) amino acid is 100 or more pieces, protein (P) may comprise only an amino acid sequence of array number (1) – (19), and above-mentioned ornamentation may be carried out, and it may contain the protein revealed from the vector for a protein manifestation. As protein revealed from the vector for a protein manifestation, the protein etc. of

glutathione transferase, a histidine tag (for example, peptide which six histidine combined), and ZZ area part of protein A are mentioned. The protein revealed from the vector for a protein manifestation is [ among these ] preferred, and the protein of glutathione transferase and ZZ area part of protein A is more preferred.

[0012]

Protein (P) may be a fusion protein created by transgenics etc., for example, the protein etc. which united with GST (glutathione S-transferase) the polypeptide which becomes considering one amino acid sequence of array number (1) – (19) as a constitutional unit are contained. When protein (P) becomes considering 100 or more amino acid sequences as a constitutional unit, the viewpoints of preparation etc. to a fusion protein is preferred.

[0013]

Protein (P) can be conventionally created by the publicly known peptide synthesis method or gene recombination. When the number of amino acid exceeds 20 pieces according to the peptide synthesis method, since it is easy, the viewpoints of the ease of preparation, etc. to gene recombination is preferred in it being gene recombination to proteinic (P) composition being very difficult.

[0014]

Although a peptide synthesis method can be attained also in a solution or on solid support, the solid-phase-synthesis method using a solid phase base material is a solid-phase-synthesis method using an automatic peptide synthesis machine desirable still more preferably. Generally the activation amino acid protected by t-butyloxy carbonyl (BOC group) or 9-fluorenyl methoxy-carbonyl (Fmoc basis) is used for a peptide synthesis method. In addition, the kind of concrete synthetic operation and side chain protection, an intercept method, etc., For example, solid Phase Peptide The 2nd edition of synthesis, piece Chemical company, 1984 (Stewart and Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", the 2nd edition, Pierce Chemical Company, 1984), And solid Phase Peptide Synthesis, eye R It is described in detail in EI and 1989 (Atherton and Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL Press, 1989).

[0015]

As gene recombination, from mRNA extracted from a human cell, for example, the Homo sapiens vascular endothelial cell, or the Homo sapiens fibroblast. cDNA is produced using the primer corresponding to the target amino acid sequence, A restriction enzyme cuts, after amplifying this by the PCR method (the polymerase chain reaction method), Hosts, such as Escherichia coli, are transformed by the expression vector obtained by building this fragment into a vector, after [ with necessity ] carrying out derivation processing, a host is cultivated, and the fusion protein made into the purpose from a biomass melted object is extracted and refined. Thus, the fusion protein containing protein (P) can be created (for example, the biochemistry laboratory procedure 45 "recombination protein producing method", Japan Scientific Societies Press, 2001). After compounding the gene which corresponds to the target amino acid sequence above else from RB1 gene amino acid sequence with a DNA synthesis machine, protein (P) can be created by including the gene in a vector and making it revealed.

[0016]

Although the reagent for immunoassay of this invention should just contain at least one sort of such protein (P), it is preferred that two or more sorts of protein (P) are included at the point that reactivity (singularity and sensitivity) with autoantibody becomes higher. Even if it is the protein which becomes considering an amino acid sequence (1) as a constitutional unit, it is preferred that the protein of other kinds is included. The amino acid sequence of an array number (2) is added to the protein which becomes as a constitutional unit still more preferably, It is that the protein which becomes considering the protein and/or the C terminal field {amino acid sequence of an array number (8), (14), or (19)}, etc. of an array number (1) which become considering the N terminal region {amino acid sequence of an array number (3), (9), or (15)}, etc. of an amino acid sequence (1) as a constitutional unit as a constitutional unit is included. It is that the protein which becomes most preferably considering the protein which becomes considering the amino acid sequence of an array number (2) as a constitutional unit, the protein which becomes considering the N terminal region of an array number (1) as a constitutional unit,

and the C terminal field of an array number (1) as a constitutional unit is included.

[0017]

As an example of combination of the desirable protein of the reagent for immunoassay of this invention, the following combination can be illustrated, for example. The number in a parenthesis supports the array number and expresses the protein which becomes considering the amino acid sequence of the array number as a constitutional unit. That is, (2)+(3) expresses the combination of the protein which becomes considering the amino acid sequence of an array number (2) as a constitutional unit, and the protein which becomes considering the amino acid sequence of an array number (3) as a constitutional unit.

[0018]

Namely, (5)+(6)+(7)(17)+(18), (5)+(6)+(18), (5)+(6)+(13), (5)+(12)+(7), (5)+(12)+(18), (5)+(12)+(13), (11)+(6)+(7), (11)+(6)+(18), (11)+(6)+(13), (11)+(12)+(7), (11)+(12)+(18), (17)+(6)+(7), (17)+(6)+(13), (17)+(12)+(7), (17)+(12)+(13), (2)+(3)(2)+(9), (2)+(15), (2)+(8), (2)+(14)(2)+(19), (2)+(3)+(8), (2)+(3)+(14), (2)+(3)+(19), (2)+(9)+(8), (2)+(9)+(14), (2)+(9)+(19), (2)+(15)+(8), (2)+(15)+(14), (2)+(15)+(19), (— five —) — + — (— six —) — + — (— seven —) — + — (— three —) — (— five —) — + — (— six —) — + — (— seven —) — + — (— nine —) — (— five —) — + — (— six —) — + — (— seven —) — + — (— 15 —) — (— five —) — + — (— six —) — + — (— seven —) — + — (— eight —) — (— five —) — + — (— six —) — + — (— seven —) — + — (— 14 —) — (— five —) — + — (— six —) — + — (— seven —) — + — (— 19 —). (5)+(6)+(7)(3)+(8)(5)+(6)+(7)+(3)+(14), (5)+(6)+(7)(3)+(19)(5)+(6)+(7)+(9)+(8), (5)+(6)+(7)(9)+(14)(5)+(6)+(7)+(9)+(19), (5)+(6)+(7)(15)+(8)(5)+(6)+(7)+(15)+(14), (5)+(6)+(7)(15)+(19)(9)+(11)+(12)+(13)+(14), (11)+(12)+(13), (17)+(18)+(3), (17)+(18)+(9), (17)+(18)+(15), (17)+(18)+(8), (17)+(18)+(14), (17)+(18)+(19)(17)+(18)+(3)+(8), (17)+(18)+(3)+(14)(17)+(18)+(3)+(19), (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— nine —) — + — (— eight —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— nine —) — + — (— 14 —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— nine —) — + — (— 19 —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— 15 —) — + — (— eight —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— 15 —) — + — (— 14 —) — and — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— 15 —) — + — (— 19 —) — it is .

[0019]

Among these (2)+(3)+(14), (2)+(3)+(19), (2)+(9)+(8), (2)+(9)+(14), (2)+(9)+(19), (2)+(15)+(8), (2)+(15)+(14), (2)+(15)+(19), (5)+(6)+(7)(3)+(8)(5)+(6)+(7)+(3)+(14), (5)+(6)+(7)(3)+(19)(5)+(6)+(7)+(9)+(8), (5)+(6)+(7)(9)+(14)(5)+(6)+(7)+(9)+(19), (5)+(6)+(7)(15)+(8)(5)+(6)+(7)+(15)+(14), (5)+(6)+(7)(15)+(19)(9)+(11)+(12)+(13)+(14), (11)+(12)+(13)(17)+(18)+(3)+(8), (17)+(18)+(3)+(14)(17)+(18)+(3)+(19), (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— nine —) — + — (— eight —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— nine —) — + — (— 14 —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— nine —) — + — (— 19 —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— 15 —) — + — (— eight —) — (— 17 —) — + — (— 18 —) — + — (— 15 —) — + — (— 14 —). (17)+(18)+(19) desirable still more preferably And (5)+(6)+(7)+(3)+(8), (5)+(6)+(7)(3)+(14)(5)+(6)+(7)+(3)+(19), (5)+(6)+(7)(9)+(8)(5)+(6)+(7)+(9)+(14), (5)+(6)+(7)(9)+(19)(5)+(6)+(7)+(15)+(8), (5)+(6)+(7)(15)+(14)(5)+(6)+(7)+(15)+(19), (17)+(18)+(3)+(8)(17)+(18)+(3)+(14), (17)+(18)+(3)+(19)(17)+(18)+(9)+(8), (17)+(18)+(9)+(14)(17)+ they are (18)+(9)+(19) / (17) (18)+(15)+(8)(17)+(18)+(15)+(14) and (17)+(18)+(15)+(19).

[0020]

Although protein (P) can be used as reagents for immunoassay, such as an immunoagglutination method, by this very thing, in this invention, it is contained in the reagent for immunity in the form which protein (P) combined with the insoluble in water nature carrier (B). The insoluble in water nature also as used in which [ 1-50 \*\* ] temperature of an insoluble in water nature carrier means that the solubility to water is below 0.01g / water 100g, and a carrier means the substance which is a solid (gel is included) also at which [ 1-50 \*\* ] temperature, and can be combined with RB1 gene product. As an insoluble in water nature carrier (B), the carrier of a statement, etc. can be used for JP,2-205774,A, Can use an inorganic substance, an organic matter, etc. and For example, cellulose, polystyrene, Polypropylene, polyolefine, polyurethane, a nitrocellulose, Cellulose acetate, polyester, an epoxy resin, phenol resin, silk, fibroin, lignin,

hemicellulose, a kitchen, ebonite, rubber, glass, quartz, silicon, ceramics, etc. are mentioned. among these — polystyrene, glass, quartz, and silicon — desirable — further — desirable — polystyrene and glass — it is glass especially preferably.

[0021]

The shape of an insoluble in water nature carrier (B) can be freely determined according to the purpose to be used, and the strip (strip-of-paper-like split) of the shape of a real ball, a disc-like bead, tabular and a cylindrical stick, a test tube and a nonwoven fabric, or a filter, particles, etc. are mentioned. A bead and particles are real ball-like beads desirable still more preferably among these.

[0022]

Although the size of an insoluble in water nature carrier (B) can be freely determined according to the purpose to be used, it is a size which can usually be supplied to cylindrical reaction vessels (beaker etc.) 4–10 mm in inside diameter, and about 10–20 mm in depth (except for the case where an insoluble in water nature carrier is a test tube). the case of a real ball-like bead — a diameter (mm) — 1–10 — desirable — further — desirable — 2–8 — it is 3–7 especially preferably. the case of a disc-like bead — a diameter (mm) — 1–10 — desirable — further — desirable — 2–8 — it is 3–7 especially preferably — thickness — (mm) — 0.1–5 — desirable — further — desirable — 0.2–2 — it is 0.3–1 especially preferably. the case of a stick — length (mm) — 2–10 — desirable — further — desirable — 3–8 — it is 4–7 especially preferably. the cross-section area ( $\text{mm}^2$ ) of a stick — 1–25 — desirable — further — desirable — 2–16 — it is 3–9 especially preferably. A cross-section area means the cross-section area of the cutting portion at the time of cutting vertically to a major axis direction. the case of a test tube — length (mm) — 5–100 — desirable — further — desirable — 8–80 — it is 10–20 especially preferably. the inside diameter (mm) of a test tube — 5–20 — desirable — further — desirable — 6–16 — it is 8–12 especially preferably. the case of a strip — length (mm) — 5–100 — desirable — further — desirable — 10–80 — it is 10–50 especially preferably. the width (mm) of a strip — 1–20 — desirable — further — desirable — 2–16 — it is 3–10 especially preferably. 0.1–2 are desirable still more preferred, and (mm) of thickness is 0.1–0.5. 0.1–10 are desirable still more preferred, and the average pore sizes (micrometer) of a nonwoven fabric or a filter are 0.3–5. the case of particles — mean particle diameter (micrometer) — 0.01–200 — desirable — further — desirable — 0.1–50 — it is 0.2–10 especially preferably. Mean particle diameter can be measured by transmission electron microscopy, the alignment measuring method by an optical microscope, etc.

[0023]

It can carry out by the method that the method of combining by the method of combining chemically and physical adsorption as a method of combining protein (P) and an insoluble in water nature carrier (B), etc. are conventionally publicly known etc. Functional groups introduced into the surface of the insoluble in water nature carrier (B) as a method of combining chemically, such as an amino group and/or a sulfhydryl group, functional groups, such as a proteinic (P) amino group and/or a sulfhydryl group, — a binding material (glutaraldehyde.) The methods (a U.S. Pat. No. 4280992 specification, a 3652761 specification, etc.) of constructing a bridge by the Succin aldehyde, m-maleimide benzoyl-N-hydronium Succin imidester, o-phenylene bis maleimide, etc., etc. are mentioned. When an insoluble in water nature carrier (B) is polystyrene as a method of combining by physical adsorption, The method (a bio-symmetrical-compounds bio-fizz actor, 251 volumes, 427 pages, 1971) of carrying out suitable time immersion of the insoluble in water nature carrier, etc. are mentioned to proteinic (P) 0.001 – 0.04% (W/V) carbonic acid buffer solution (pH 9.0). A carrier can apply this method to substances, for example, polypropylene, silicon, glass, cellulose, etc. other than polystyrene. Protein (P) and an insoluble in water nature carrier (B) are also combinable indirectly using specific binding material (for example, an antigen-antibody, avidin biotin, a lectin sugar chain, a complementary gene chain, etc.). For example, protein (P) is combinable with an insoluble in water nature carrier (B) by embellishing protein (P) with biotin and reacting to the insoluble in water nature carrier which combined avidin. As avidin, egg white origin avidin, streptoavidin, etc. can be used, and

streptoavidin is preferred. Among these specific binding material, about an antigen-antibody, avidin biotin, and a lectin sugar chain. The combination of the thing of a statement and the complementary gene of the with a publication-of-patent-applications common [ No. 186232 / six to ] statement as a complementary gene, for example, poly deoxyadenylic acid, and poly T, etc. are mentioned in [the biochemistry laboratory procedure 11 "enzyme immunoassay", Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd., and 1989].

[0024]

When the proteinic (P) amino acid number is 20-100, especially the method that used avidin biotin combination among the methods of the method of using specific binding material being used preferably, and using specific binding material is [ among these ] preferred. When the proteinic (P) amino acid number is 100 or more, the method of combining chemically and the method by physical adsorption are preferred, and are the method of combining chemically most preferably. When combining the protein of the 20-100 amino acid number, and the protein of the 100 or more amino acid number, after mixing the protein of ABICHIN and the 100 or more amino acid number and making it combine with an insoluble in water nature carrier (B) for example, it is made to react to the protein embellished with biotin.

[0025]

Although in the state immersed in suitable buffer solution may be sufficient as it, after the reagent for immunoassay of this invention combines protein (P) and an insoluble in water nature carrier (B), its state where it coated and dried in sugars and/or protein is preferred. As buffer solution, a phosphate buffer solution, the buffer solution of good (Good), etc. can be used, and protein, a salt, a surface-active agent, etc. may be contained. as protein -- albumin (cow serum albumin and rabbit serum albumin.) Antibodies (antibody without unity with protein (P), such as the normal rabbit IgG and normal mouse IgG), such as mouse serum albumin, ovalbumin, conalbumin, and lactalbumin, gelatin, etc. are mentioned. As a salt, sodium chloride, potassium chloride, a lithium bromide, etc. are mentioned. As a surface-active agent, nonionic surface active agents, such as a sorbitan lauric acid monoester ethylene oxide addition (trade name: Tween 20 and Tween 40, and the ICI United States), etc. are mentioned. The method (JP,09-318628,A and JP,5-41946,B) of drying, after being immersed as coating and a drying method into the solution which contains sugars at least, etc. are mentioned. As sugars, NI sugars and monosaccharide are preferred and as NI sugars, Maltose, cellobiose, a gentiobiose, a melibiose, sucrose, lactose, isosaccharose, etc. are mentioned, and glucose, fructose, mannose, galactose, arabinose, xylitolose, etc. are mentioned as monosaccharide. among these -- lactose, sucrose, glucose, and fructose -- desirable -- further -- desirable -- lactose and sucrose -- it is sucrose especially preferably. When coating, a public domain may be sufficient as the concentration of the solution (coating fluid) containing a coating amount (content, such as sugars), sugars, etc., the kind of solution, etc., for example, they are indicated to JP,09-318628,A, JP,5-41946,B, etc.

[0026]

As for the reagent kit for immunoassay of this invention, it is preferred to contain the anti human immunoglobulin antibody with the reagent for immunoassay of this invention. It is the use which was conventionally created by the publicly known method, and an anti human immunoglobulin antibody is \*\*. For example, an antibody can be refined and created with curing salting, ionic exchange column chromatography, etc. from the antiserum obtained by carrying out immunity of the Homo sapiens immunoglobulin to suitable animals (for example, a mouse, a rabbit, a swine, a goat, a horse, etc.). A polyclonal antibody or a monoclonal antibody may be sufficient as an anti human immunoglobulin antibody, and antibody fragments, such as  $(Fab')^2$  and Fab', may be sufficient as it. Although the Homo sapiens immunoglobulin contains all the immunoglobulins, such as IgG, IgA, and IgM, they are usually IgG and IgM and is mainly IgG.

[0027]

Although an anti human immunoglobulin antibody is good also in a sign not being carried out, either, it is preferred that the sign is carried out with the labeled compound from points, such as sensitivity and the simple nature of measurement. When the sign of the anti human

immunoglobulin antibody is not carried out with a labeled compound, the reagent etc. which carried out the sign of the antibody (for example, anti-mouse IgG antibody created with the rabbit when an anti human immunoglobulin antibody was IgG of a mouse) which recognizes an antihuman globulin antibody are used. As a labeled compound, a publicly known thing can be used conventionally, and radioisotope, a fluorescent substance, photogene, an enzyme, etc. are used.

As an isotope, <sup>125</sup>I etc. are mentioned and a europium complex etc. are mentioned as a fluorescent substance, N-methyl AKURIJUMU ester etc. are mentioned as photogene and horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, \*\*-galactosidase, etc. are mentioned as an enzyme. the enzyme among these labeled compounds — desirable — further — desirable — horseradish peroxidase, the alkaline phosphatase, and \*\*-galactosidase — they are horseradish peroxidase and the alkaline phosphatase especially preferably.

[0028]

The method of carrying out the sign of the labeled compound to an anti human immunoglobulin antibody can apply a publicly known method etc. conventionally, "New Biochemistry Experiment Lectures 5 immunobiochemistry laboratory procedure" (the method of the edited by Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dojin, the 1986 issue, and a 102-112-page statement, etc. are used, for example, the method of following (1) - (4), etc. can be applied.)

(1) How to introduce the radioactive iodine into the tylosin residue of an anti human immunoglobulin antibody, using chloramine T as an oxidizer when a labeled compound is an isotope.

(2) How to make a fluorescein isothiocyanate react to an anti human immunoglobulin antibody in buffer solution, and combine with lysine residue of an anti human immunoglobulin antibody when a labeled compound is a fluorescent substance.

(3) How to make the trade name "an acridinium derivative - I" (made by member Institute for Chemical Research) react to an anti human immunoglobulin antibody in buffer solution, and combine with the amino group of an anti human immunoglobulin antibody when a marker is photogene.

(4) How to combine the amino group which an enzyme has, and the thiol group which an anti human immunoglobulin antibody has with NI cross-linking reagents, such as N-succinimidyl 6-MAREIDO hexanoate, when a marker is an enzyme.

[0029]

If the reagent for immunoassay of this invention is included in the reagent kit for immunoassay of this invention, there will be no restriction in the pharmaceutical form of a reagent, the composition of a reagent kit, etc. That is, the reagent kit of this invention is applicable to homogeneous immunoassay, such as latex agglutination and a latex turbidimetric assay method, and heterogeneous immunoassay. In respect of sensitometry, a heterogeneous immunoassay method is preferred and the heterogeneous reagent kit for sandwiches immunoassay which a sign is carried out in a labeled compound and contains an anti human immunoglobulin antibody is [ among these ] the most preferred. That is, if the reagent for immunoassay and sample of this invention are made to react, only the autoantibody to RB1 gene product will combine with protein (P) specifically. Then, if an anti human immuno GUROBUN antibody is added, it will combine with autoantibody and this antibody will form the immune complex "protein (P)-autoantibody-anti human immunoglobulin antibody." A fixed quantity of the amounts of autoantibodies are made by quantifying the anti human immunoglobulin antibody in this immune complex. When the anti human immunoglobulin antibody is carrying out the sign with the labeled compound, the amount of anti human immunoglobulin antibodies can be quantified by measuring the quantity of a labeled compound.

[0030]

Measurement of a labeled compound can be conventionally carried out by a publicly known method etc. according to the kind of labeled compound. When a labeled compound is a fluorescent substance, the fluorescence amount produced, for example by the exposure of the excitation light of suitable wavelength is quantified with a photo-multiplier. When a labeled compound is a chemiluminescence substance, for example with acridinium ester, the light

quantity produced by adding an alkali solution is quantified with a photo-multiplier.

[0031]

When a labeled compound is an enzyme, enzyme activity can be measured by making a suitable substrate react as an absorbance (spectrophotometry), a fluorescence amount (fluorescence amount measuring method), or light quantity (the amount measuring method of chemiluminescence). For example, when an enzyme is peroxidase, as a substrate, 2,2'-horse mackerel no bis(3-ethylbenzo thiazoline 6-sulfonic acid)2 ammonium (ABTS) (spectrophotometry), luminol/peroxide (the amount measuring method of chemiluminescence), etc. can be chosen. When an enzyme is alkaline phosphatase, as a substrate P-nitrophenylphosphate (spectrophotometry), 4-methyl umbelliferyl phosphoric acid (4-MUP) (fluorescence amount measuring method) and the 3-(2'-spiro adamantane)-4-methoxy-4-(3" phosphoryl oxy) phenyl- 1, 2-JIOKI cetane, disodium (AMPPD) (the amount measuring method of chemiluminescence), etc. can be chosen. As for an absorbance, a spectrophotometer, a fluorescence amount, and the amount of chemiluminescence are quantified by a photo-multiplier. The amount measuring method of chemiluminescence among these preferably (that is, as a method of quantifying autoantibody using the reagent kit of this invention, chemiluminescence enzyme immunoassay is preferred.), It is the amount measuring method of chemiluminescence by the combination of peroxidase, and luminol/peroxide, or the combination of alkaline phosphatase and AMPPD still more preferably.

[0032]

As luminol, luminol, isoluminol, N-aminoethyl-N-ethyliso luminol (AHEI), N-aminobutyl-N-ethyliso luminol (ABEI), these metal salt, etc. are contained. As these metal salt, alkaline metal salts (sodium, potassium, etc.), alkaline-earth-metals salts (calcium, magnesium, etc.), etc. can be used. among these -- metal salt of luminol and luminol -- desirable -- further -- desirable -- metal salt of luminol -- it is sodium salt of luminol especially preferably. As a peroxide, both an inorganic peroxide and organic peroxide can be used. As an inorganic peroxide, hydrogen peroxide, sodium perborate, potassium perboric acid, hyperoxidation acid, hyperoxidation carbonic acid, hyperoxidation 2 carbonic acid, hypochlorous acid, potassium hypochlorite, a chlorous acid, chloric acid, sodium chloride, perchloric acid, perbromic acid, pel OKUSO sulfuric acid, pel OKUSORIN acid, etc. are mentioned. As organic peroxide, peracetic acid, fault propionic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO), triethylamine oxide, methyldi ethylamine oxide, hyperoxidation phthloyl, etc. are mentioned. The viewpoints of preservation stability etc. to an inorganic peroxide is hydrogen peroxide desirable still more preferably among these.

[0033]

the reagent which contains an anti human immunoglobulin in the reagent (reagent for immunoassay of this invention) which protein (P) and an insoluble in water nature carrier (B) combine with the reagent kit for immunoassay of this invention preferably -- in addition, Furthermore, the buffer solution for immunoreaction, the buffer solution for B/F separation, a control sample, etc. can be included. As the buffer solution for immunoreaction, and buffer solution for B/F separation, the buffer solution etc. which are conventionally used for immunoassay can be used, and the phosphate buffer solution containing protein, a salt, a surface-active agent, etc., the buffer solution of good (Good), etc. can be used. Protein, a salt, the thing same as a surface-active agent as the above, etc. are mentioned.

[0034]

A control sample is used as a comparison sample for judging whether the autoantibody to RB1 gene product exists in a sample, and the sample (positive control) which usually contains the sample (negative control) which does not contain autoantibody, and autoantibody is prepared. As negative control, the buffer solution for immunoreaction, the buffer solution containing the same protein etc., the Homo sapiens pooled serum that does not hold the autoantibody to RB1 gene product, etc. can be used. As positive control, the buffer solution (the same protein as the buffer solution for immunoreaction is contained) etc. which added the Homo sapiens pooled serum which holds the autoantibody to RB1 gene product, and the blood serum containing the autoantibody to RB1 gene product can be used.

[0035]

Especially if it is body fluid of the *Homo sapiens* origin, it will not be limited, for example, blood, urine, saliva, lymph, bile, gastric juice, pancreatic juice, etc. are mentioned, and the homogenate extract of an organization etc. which were further extracted from the living body can be used for the sample measured with the reagent kit for immunoassay of this invention. Blood and urine are blood (whole blood, a blood serum, or plasma is included) desirable still more preferably among these.

[0036]

The example (processes 1–6) of the method (sandwich measuring method) of detecting the autoantibody to RB1 gene product using the reagent kit of this invention is shown below.

The reagent for immunoassay (reagent for immunoassay of this invention) with which it comes to combine a process 1. sample, and protein (P) and an insoluble in water nature carrier (B) is made to react, and a reaction mixture (the complex 1 of the process 2 is included) is obtained.

Except for an unreacted material (B/F separation), the complex 1 is obtained from the reaction mixture of the process 2. process 1.

The complex 1 obtained at the process 3. process 2 and the anti human immunoglobulin antibody by which the sign was carried out with the labeled compound are made to react, and a reaction mixture (the complex 2 of the process 4 is included) is obtained.

Except for an unreacted material (B/F separation), the complex 2 is obtained from the reaction mixture of the process 4. process 3.

The quantity of the labeled compound of the process 5. complex 2 is measured.

As compared with a reference value (negative control and/or positive control), the existence of autoantibody is judged using the quantity of a process 6. labeled compound.

[0037]

In the process (an above-mentioned example process 6) of judging the existence of the autoantibody to RB1 gene product in a sample, The amount of anti human immunoglobulin antibodies to the blood which is a sample (measured as an amount of labeled compounds by which the sign was carried out to the anti human immunoglobulin), It is preferred to judge the existence of autoantibody by comparing the reference value set up from the amount of anti human immunoglobulins in two or more healthy persons' blood (measured as an amount of labeled compounds by which the sign was carried out to the anti human immunoglobulin). The setting method of a reference value can be performed by the method indicated by "the clinical diagnostic guides 1999–2000, p64–71 and BUNKODO (1999)", and "the clinical laboratory test data book 1997–1998, p8–13, and Igaku-Shoin (1997)", for example. That is, two or more healthy persons (at least 50 or more persons, preferably 120 or more persons) are measured, and the amount of labeled compounds is calculated (in the case of chemiluminescence enzyme immunoassay, it becomes light quantity). [parametric methods, such as a statistical work {parametric method and a nonparametric method, use the amount of labeled compounds, when parent population shows a normal distribution (good even if it carries out exponentiation conversion), and a nonparametric method is used when parent population does not do a normal distribution. }] is carried out and it is considered as the reference interval which searches for the range containing 95% of sample groups, and a maximum is set to an upper limit reference value, and a minimum is set to a lower limit reference value. Therefore, although a possibility of having autoantibody about the sample beyond an upper limit reference value is high, a healthy person may also exceed with the probability of 5%. In order to prevent this, setting up the cutoff value which usually multiplied the upper limit reference value by the coefficient further, and/or was added is performed. That is, the sample beyond a cutoff value is judged as a thing with autoantibody. Although setting out of a cutoff value is set up by the relation between an upper limit reference value and the value of the distribution minimum of a sample which has the autoantibody to RB1 gene product, it is usually an about 1.5 to 3 times [ of an upper limit reference value ] value.

[0038]

Above-mentioned negative control and positive control are prepared so that the set-up cutoff value can be reproduced simply. For example, setting out of \*\* — the average value of the negative control from which 3 times of the measured value (the amount of labeled compounds)

of negative control become a cutoff value, and positive control turns into a cutoff value -- is possible.

[Example]

[0039]

Hereafter, although an example explains this invention further, this invention is not limited to this.

[0040]

Production of <example 1 of creation> RB1 gene product (GST fusion protein)

International Journal OBU According to the method of one koro G (Int.J.Oncology), 19 or 1035 pages, and a statement [ 2001 ], the fusion protein with GST (glutathione S transferase) was produced as follows.

[0041]

1. Preparation of RB1 gene

RNA was extracted from human umbilical cord venous blood pipe endothelial cells [Human Umbilical Vein Endothelial Cell (it purchases from Funakoshi Co., Ltd.)]. extraction -- AGPC (Acetate buffer, Guanidinium thiocyanate, phenol, chloroform) -- it carried out as follows using law.

[0042]

(Preparation of the AGPC method reagent)

(1) Preparation of 1M sodium acid citrate (pH 7.0)

After having added citrate after dissolving 29.4 g of trisodium citrate in 80 ml of distilled water, and uniting with pH 7.0, distilled water was added at 25 \*\* to make 100 ml. And it was used after carrying out autoclave sterilization (120 \*\*, 20 minutes).

(2) Preparation of D liquid

GTC(GUANIJIUMU thiocyanate) 236.3g (4M), Zarko Schill (L-Lauroylsarcosine) 2.5 g (0.8 % of the weight), After carrying out the uniform dissolution of 12.5 ml (25mM) 1M sodium-acid-citrate buffer solution (pH 7.0) and 250 ml of the distilled water at 85 \*\*, it returned to the room temperature (25 \*\*); and united with 496 ml with distilled water. It filtered and saved with the pole diameter bottle top filter of 0.45 micrometer. 2-mercaptoethanol 360microl (0.1M) was added to 50 ml of this stock solution at the time of use, and it was considered as D liquid.

(3) Preparation of 2M sodium acetate (pH 4.0)

sodium acetate TORIHA -- ide -- after dissolving the rate of 27.2 g in 10 ml of distilled water, it united with pH 4.0 using acetic acid, and distilled water was added to make 100 ml at 25 \*\*. It was filtered and used with the pole diameter bottle top filter of 0.45 micrometer.

[0043]

(Operation of the AGPC method)

(1) 0.5 ml of D liquid was added to the tube, human umbilical cord venous blood pipe endothelial cells were distributed, and the cell was destroyed.

(2) Whenever it added 2M sodium acetate 50mul, 0.5 ml of phenol, and chloroform / isoamyl alcohol (volume ratio 49/1) 100microl one by one and put it in one kind further, the tube was shaken 2 to 3 times and mixed.

(3) After mixing violently for 10 seconds, it ice-cooled for 15 minutes.

(4) With the centrifugal acceleration 10,000G, after carrying out the at-long-intervals heart for 20 minutes, 10 \*\* of water layers divided into the lower part were isolated preparatively in another tube so that the interlayer containing DNA might not mix.

(5) 0.5 ml of isopropanol was added to the water layer isolated preparatively, and it cooled at -20 \*\* for 1 hour. Next, the at-long-intervals heart (10,000G, 0 \*\*) was carried out for 10 minutes, and RNA was settled.

(6) Dissolve RNA which precipitated in 0.5 ml of D liquid again, add 0.5 ml of isopropanol, and place at -20 \*\* for 1 hour.

(7) Carry out centrifugality, settle RNA, wash precipitate by ethanol solution 1mL 80% of the weight, and dissolve in water after making it dry.

[0044]

Thus, from extracted RNA, the trade name "Redi Thu -\*\*\*\* RT-PCR bead" (Ready-To-Go RT-

PCR Beads and Amersham) was used, and composition and amplification of cDNA were performed. Namely, Redi Thu -\*\*\*\* for 95 \*\* after it adds RNA and 3' primer solution corresponding to the amino acid sequence of the example of creation 1 statement of Table 1 to a RT-PCR bead and 42 \*\* reacts to it for 1 hour, and 5 minutes -- warming -- it processed and cDNA was compounded. Then, 5' primer is added to the reaction mixture containing cDNA, and it is a DENACHU ration reaction (95 \*\*) about PCR (polymerase chain reaction). It carried out in 30 cycles using the thermal cycler for PCR (MP PCR thermal cycler, TAKARA SHUZO make) on condition of the annealing reaction (60 \*\*, 1 minute) and the elongation reaction (72 \*\*, 1 minute), and amplified cDNA was obtained for 1 minute.

[0045]

## 2. Creation and manifestation of recombinant gene

Obtained cDNA. They are molecular cloning and A to the BamHI/EcoRI part of vector pGEX-4T-3 (it purchases from Amersham) for a manifestation. Laboratory The 2nd edition (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed) of a manual, It incorporated by the method of the statement in 1989. After checking that the path of insertion of cDNA is correctly incorporated by the sequence method, 37 \*\* and 2-hour derivation were applied after transforming in Escherichia coli BL21 (DE3) and LysS (Novagen) in the culture medium containing the isopropylthio beta galactoside (IPTG) of 0.1mM. the cell lysate of the Escherichia coli prepared by ultrasonic crushing -- the target fusion protein -- glutathione bonding affinity gel (trade name: -- the glutathione sepharose 4B.) It refines by the affinity chromatography method using the product made by Amersham (eluate: 0.02M tris(hydroxymethyl) aminomethane / chloride buffer solution containing the reduced glutathione of 10mM), GST fusion protein GST1 {the protein which becomes considering the amino acid sequence of an array number (2) as a constitutional unit} was prepared.

[0046]

### <The examples 2-7 of creation>

The GST fusion protein (GST 2-7) was prepared like the example 1 of creation except having used 3 'primer and 5' primer shown in Table 1.

[0047]

[Table 1]

	GST融合蛋白質	構成単位となるアミノ酸配列の配列番号	3'プライマーの塩基配列の配列番号	5'プライマーの塩基配列の配列番号
作成例	1 GST1	(2)	(20)	(21)
	2 GST2	(9)	(22)	(23)
	3 GST3	(10)	(24)	(25)
	4 GST4	(11)	(26)	(27)
	5 GST5	(12)	(28)	(29)
	6 GST6	(13)	(30)	(31)
	7 GST7	(14)	(32)	(33)

[0048]

### <Example 1>

#### 1. Creation of GST1 joint bead

Added 1000 glass beads (made by an immuno chemical company) 3.2 mm in diameter to the polyethylene bottle with a lid containing 1 % of the weight gamma-aminopropyl triethoxysilane content acetone solution 20mL, it was made to react at 25 \*\* for 1 hour, and suction removal of the reaction residual liquor was carried out with the aspirator.

Subsequently, after having added deionized water 20mL, covering and carrying out inversion stirring of the polystyrene bottle twice slowly, suction removal of the liquid was carried out with the aspirator, and the glass bead was washed. This washing operation was performed 3 times. Subsequently, 1000 glass beads after this washing were made to react at 25 \*\* for 1 hour in addition to the polyethylene bottle with a lid into which glutaraldehyde water content solution 20mL went 2% of the weight, and suction removal of the reaction residual liquor was carried out with the aspirator. And after having added deionized water 20mL, covering and carrying out inversion stirring of the polystyrene bottle twice slowly, suction removal of the liquid was carried out with the aspirator, and the glass bead was washed. This washing operation was performed 3 times.

1000 glass beads after this washing were made to react at 25 \*\* furthermore for 1 hour in addition to the polyethylene bottle with a lid containing 0.02M phosphate buffer solution (pH 8.7) 20mL which contains GST1 by the concentration of 20microg/mL.

The GST1 content phosphate buffer solution was removed after the reaction, and 4 \*\* was immersed in the 0.1-% of the weight cow serum albumin content phosphate buffer solution (pH 7.2) of 20mL for 8 hours. Then, after it carries out suction removal of the buffer solution with an aspirator and the 0.1-% of the weight cow serum albumin content phosphate buffer solution (pH 7.2) of 20mL washes a bead twice, 10% of the weight of sucrose to the included phosphate buffer solution (pH 7.2) After the immersion during 30 minutes, The phosphate buffer solution was removed with the aspirator, the bead was scattered on the filter paper, air-drying and the GST fusion protein joint bead 1 (reagent 1 for immunoassay of this invention) were adjusted at the room temperature (about 25 \*\*), and refrigeration (2-10 \*\*) preservation was carried out in the well-closed container into which the drier (silica gel) was put.

[0049]

## 2. Creation of buffer solution for immunoreaction

It added so that it might become a phosphate buffer solution (pH 8.0) of 0.02M about casein and might become the concentration of 8.5 g/L about 3 g/L and sodium chloride, and the buffer solution for immunoreaction was created. Refrigeration (2-10 \*\*) preservation of the time of use was carried out.

[0050]

## 3. Creation of peroxidase-labeling anti human immunoglobulin antibody

An anti human immunoglobulin polyclonal antibody (product made from DAKOJAPAN) and horseradish origin peroxidase (made by Toyobo Co., Ltd.) are used, Literature [S Yoshitake, em Imagawa, E Ishikawa, Ethol; To Jay . by OKEMU and Vol.92 (1982) 1413 -1424-page], by the method of a statement a peroxidase-labeling anti-beta2-micro globulin polyclonal antibody [solution of the phosphate buffer solution (pH 6.0) of 0.02M which is the protein concentration of 1 mg/mL]. Frozen (-30 \*\*) preservation was prepared and carried out.

[0051]

## 4. Creation of enzyme labelled antibody liquid

Enzyme labelled antibody liquid was created using the immunoreaction buffer solution and the peroxidase-labeling anti human immunoglobulin antibody which were created above as follows. That is, 100microg addition of the peroxidase-labeling anti human immunoglobulin antibody was carried out with the protein volume, stirring mixing was carried out and this was made into enzyme labelled antibody liquid at buffer solution 100mL for immunoreaction.

[0052]

## 5. Preparation of hydrogen peroxide liquid

The 35-% of the weight hydrogen peroxide solution of 200microl was dissolved in 1 l. of deionized water, and it was considered as hydrogen peroxide solution. Refrigeration (2-10 \*\*) preservation was carried out until it used it.

[0053]

## 6. Preparation of substrate liquid

0.18g of luminol (made in Tokyo Chemicals) and the 4-(cyano methylthio) phenol 0.1g (made by 3 Japanese Federation of Chemical Industry Workers' Unions) were dissolved in 0.1M (a mol/L), and 1 l. of the tris(hydroxymethyl) aminomethane / chloride buffer solution of pH 8.5.

Refrigeration (2-10 \*\*\*) preservation was shaded and carried out until it used it.

[0054]

<Examples 2-10>

1. Creation of RB1 gene-product (GST fusion protein) joint bead

It changed to GST1, and except having used the GST fusion protein shown in Table 2, like Example 1, the GST fusion protein joint beads 2-10 (reagents 2-10 for measurement of this invention) were adjusted, and refrigeration (2-10 \*\*\*) preservation was carried out in the well-closed container into which the drier (silica gel) was put.

When using it combining two or more GST fusion proteins (examples 8-10), the quantity of each GST fusion protein presupposes that it is the same, and it was made for a total amount to become 20microg/mL. What was created in Example 1 was used for the buffer solution for immunoreaction, a peroxidase-labeling anti human immunoglobulin antibody, enzyme labelled antibody liquid, hydrogen peroxide liquid, and substrate liquid.

[0055]

<Example 11>

It is the example which measured the healthy person pooled serum and a cancer patient blood serum.

1. Sample

Every 0.2 mL each of blood serums extracted from 50 healthy person volunteers were mixed, healthy person pooled-serum 10mL was created, and it was considered as the sample 1. Ten mL (s) each were prepared and the blood serum (patients 1-3) obtained from the cancer patient was used as the samples 2-4.

[0056]

2. Immunoreaction operation

Into a 12x75-mm test tube, buffer solution 300for immunoassay muL, sample 1(healthy person pooled serum)10microL, and one GST fusion protein joint bead were added, and it was made to react for 10 minutes at 37 \*\*. After the aspirator removed reaction residual liquor, the \*\*\*\* bead was washed for physiological saline 2mL, and the aspirator removed the penetrant remover. Furthermore physiological saline 2mL was added and it washed similarly. Next, enzyme labelled antibody liquid 300muL was added to the bead after washing, and was made to react 37 \*\* for 10 minutes. The aspirator removed reaction mixture, physiological saline 2mL was added, the bead was washed, and the aspirator removed the penetrant remover. Furthermore physiological saline 2mL was added and it washed twice similarly. About the bead after washing, enzyme activity was measured as follows. Enzyme activity was similarly measured about the samples 2-4.

[0057]

3. Enzyme activity measurement operation

The test tube (12x75 mm) containing the bead after washing was set to the Aloka luminescence leader BLR-201 type sample holder, substrate liquid 200muL and hydrogen-peroxide-solution 200muL were added, and the chemiluminescence reaction was started. Addition measurement of the light quantity for 10 seconds after after [ of a luminous reaction start ] 40 seconds was carried out, and this was made into the light quantity which shows enzyme activity.

[0058]

4. Measurement result

The measurement result of light quantity was shown in Table 2. As for the numerical value in Table 2, the upper row shows light quantity, and the lower berth is a relative value of each light quantity when light quantity of the healthy person pooled serum is set to 1.0.

In a cancer patient, it turns out that measurement light quantity is higher than the light quantity of the healthy person pooled serum, and a light quantity ratio (value which \*\*(ed) each measurement light quantity with the measurement light quantity of the healthy person pooled serum for the numerical value of the lower berth in front) is large. In patient's serum, even if reactivity may be low to an individual GST fusion protein, by combining two or more GST fusion proteins shows that sensitivity improves. A light quantity ratio has a high combination which includes all the fields of an E1A coupling region especially, and sensitivity is improving.

[0059]

[Table 2]

		GST融合蛋白質	測定発光量(cps)			
			健常人プール 血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
実施例	1	GST1	3365 1.0	9686 2.9	19370 5.8	24307 7.2
	2	GST2	3238 1.0	6742 2.1	7164 2.2	7368 2.3
	3	GST3	3418 1.0	4364 1.3	5248 1.5	5926 1.7
	4	GST4	3721 1.0	9597 2.6	16397 4.4	20370 5.5
	5	GST5	3647 1.0	7591 2.1	12760 3.5	24063 6.6
	6	GST6	3367 1.0	10836 3.2	10347 3.1	18062 5.4
	7	GST7	3517 1.0	6928 2.0	9087 2.6	12068 3.4
	8	GST4,GST5,GST6	3449 1.0	11307 3.3	20101 5.8	21302 6.2
	9	GST1,GST2,GST7	3463 1.0	12645 3.7	24378 7.0	32086 9.3
	10	GST4,GST5,GST6, GST2,GST7	3397 1.0	15966 4.7	28301 8.3	26640 7.8

[0060]

## &lt;Comparative example 1&gt;

This comparative example is an example which measured by the method by conventional technology.

## 1. Blotting of GST fusion protein

Blotting to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and a nitrocellulose filter was performed for 1 microeach g of GST1-GST7 which were created in the examples 1-7 of creation using the Pharmacia manufacture "fast system (PhastSystem)." electrophoresis — as gel — a Pharmacia manufacture — "— fast gel homogeneous (PhstGel Homogeneous) 12.5". It carried out in the temperature of 15 \*\*, the voltage 250V, and migration 2 hours, using the Pharmacia manufacture "fast GERUSUDIESU buffer strip (PhstGel SDS Buffer Strips)" as a migration buffer. Blotting of the GST protein was carried out to the nitrocellulose membrane (made by Millipore Corp.) using the Pharmacia manufacture "fast transfer (PhstTransfer) semi dry blotting" from the gel which migrated. 25mM tris(hydroxymethyl) aminomethane buffer solution (pH 8.3) containing a 192mM glycine and 10 capacity % methanol was used for the blotting buffer. Blotting was performed in the temperature of 15 \*\*, the voltage 20V, and migration 30 minutes.

[0061]

## 2. Detection of autoantibody in sample

This membrane was dipped in the powdered-skim-milk content 0.02M phosphate buffer solution (pH 7.0) at the room temperature (25 \*\*) 5% of the weight for 8 hours. The membrane was taken out, it was immersed in the solution which diluted the sample 1 (healthy person pooled serum) with the powdered-skim-milk content 0.02M phosphate buffer solution (pH 7.0) 400 times 5% of the weight, and 25 \*\* was made to react for 3 hours. Subsequently, the filter was taken out, and after neglecting it, shaking 25 \*\* to Tween20 content 0.02M phosphate buffer solution (7.0) 0.1% for 1 hour, the filter was washed by removing liquid with an aspirator. This washing was carried out 3 times. It was immersed in the enzyme labelled antibody liquid which created the washed filter in Example 1, and 25 \*\* reacted for 1 hour. Above-mentioned washing was performed 6 times similarly. The washed filter was immersed in the 0.05M tris(hydroxymethyl)

aminomethane / chloride buffer solution of 100mL containing 50 mg of 3,3'-diaminobenzidine (pH 7.6), and 25 \*\* reacted for 10 minutes. After performing above-mentioned washing 5 times (however, leaving times 10 minutes) and air-drying a filter at 25 \*\*, the produced coloring band was checked visually. The coloring band was similarly inspected visually about the samples 2-4 (the cancer patients' 1-3 blood serum).

[0062]

### 3. Evaluation

comparing with the band (it is hardly generated or is very weak) in the case of a healthy person Boolean blood serum -- the case of the same grade as a healthy person Boolean blood serum -- and the case where it is slightly strong -- \*\* and the case where it is strong -- + -- a table -- in the bottom, the result was shown in Table 3. Even when there was an S/N difference clearly in Example 11, in the comparative example 1, there was a case where it became - or \*\* judging. It was subjective judgment by viewing, and it was so delicate that the judgment of the comparative example 1 had a possibility that a result might change with judgment persons. On the other hand, since the method of this invention can be measured clearly as a numerical value as Example 11 showed, such problems do not exist.

[0063]

[Table 3]

GST融合蛋白	測定発光量(cps)		
	患者1血清	患者2血清	患者3血清
GST1	+	+	+
GST2	±	±	±
GST3	-	-	±
GST4	±	+	+
GST5	-	±	+
GST6	±	+	+
GST7	-	±	+

[0064]

<Example 12>

It is the example which measured two or more healthy person blood serums, calculated the reference value, set up the cutoff value, measured the blood serum from ten cancer patients, and judged the existence of the autoantibody to RB1 gene product.

[0065]

### 1. Measurement of sample

The blood serum sample from 120 healthy person volunteers and the sample 1 (healthy person pooled serum) of Example 11 were measured like the method of Example 11 using the GST fusion protein (GST4, GST5, GST6, GST2, and GST7) joint bead 10 prepared in Example 10. Distribution of 120 healthy person volunteers' measured value (light quantity) was shown in drawing 1. The horizontal axis of a figure is light quantity (cps), and a point shows distribution (one point corresponds to one sample) of a sample.

[0066]

### 2. Setting out of cutoff value

As a result of analyzing a distribution pattern for the measured value (light quantity) of the blood serum sample from 120 healthy person volunteers, and the sample 1 using statistical work software "STATFLEX v.4.1" (made by ATEKKU), light quantity distribution was skewness 1.49 and kurtosis 4.90. The normal distribution of this distribution had not been carried out. When asked for 95% of confidence interval with the nonparametric method, the reference value was the

light quantity 1606–7547. When light quantity 1.5 times the light quantity of a maximum was set to the cutoff value here, it was the light quantity 11321. At this time, the light quantity of the sample 1 (healthy person pooled serum) was 3406, and was 1/3.32 of the cutoff value. Therefore, when the sample 1 (healthy person pooled serum) was measured as negative control, it was set to cutoff value = "healthy person pooled-serum measurement light quantity" x3.32.

[0067]

### 3. Measurement of sample

The sample 1 (healthy person pooled serum) created in Example 11 as the blood serum samples 5–14 extracted from ten cancer patients (patients 4–13) and negative control was measured. Measurement was performed like Example 11 using the GST fusion protein joint bead 10 of Example 10.

[0068]

### 4. Decision result

The sample 1 (healthy person pooled serum) was made into negative control, and the cutoff value ("healthy person pooled-serum measurement light quantity" x coefficient) was calculated by the coefficient set up by the above 2. In light quantity, an autoantibody positivity, one side, and light quantity judged the measured value of less than the cutoff value (less than [ cutoff ratio 1.0 ]) to be autoantibody negativity for the measured value more than a cutoff value (more than cutoff ratio 1.0). These results were shown in Table 4.

[0069]

[Table 4]

検体	発光量(cps)	カットオフ比	判定
健常人プール血清	3406	—	—
患者4	23601	2.1	陽性
患者5	15420	1.4	陽性
患者6	21307	1.9	陽性
患者7	7370	0.7	陰性
患者8	20677	1.8	陽性
患者9	9834	0.9	陰性
患者10	29067	2.6	陽性
患者11	196078	17.3	陽性
患者12	21937	1.9	陽性
患者13	41908	3.7	陽性
カットオフ値	11308	1.0	—

[0070]

From Table 4, the autoantibody to RB1 gene product was judged by high frequency (inside of ten persons eight persons) by the cancer patient to be a positivity. The possibility that the method of this invention was useful to diagnosis of cancer was shown.

[0071]

<The examples 8–15 of creation>

The GST fusion protein (GST 8–15) was prepared like the example 1 of creation except having used 3 'primer and 5' primer shown in Table 5.

[0072]

[Table 5]

	GST融合蛋白質	構成単位となるアミノ酸配列の配列番号	3'プライマーの塩基配列の配列番号	5'プライマーの塩基配列の配列番号
作成例	8 GST8	(3)	(34)	(23)
	9 GST9	(5)	(35)	(27)
	10 GST10	(6)	(36)	(29)
	11 GST11	(7)	(37)	(31)
	12 GST12	(8)	(32)	(33)
	13 GST13	(15)	(38)	(23)
	14 GST14	(17)	(39)	(21)
	15 GST15	(18)	(40)	(41)

[0073]

<Examples 13-28>

1. Creation of RB1 gene-product (GST fusion protein) joint bead

It changed to GST1, and except having used the GST fusion protein shown in Table 6 or 7, like Example 1, the GST fusion protein joint beads 11-26 (reagents 11-26 for measurement of this invention) were adjusted, and refrigeration (2-10 \*\*\*) preservation was carried out in the well-closed container into which the drier (silica gel) was put.

When using it combining two or more GST fusion proteins (examples 19-26), the quantity of each GST fusion protein presupposes that it is the same, and it was made for a total amount to become 20microg/mL. What was created in Example 1 was used for the buffer solution for immunoreaction, a peroxidase-labeling anti human immunoglobulin antibody, enzyme labelled antibody liquid, hydrogen peroxide liquid, and substrate liquid.

[0074]

<Example 29>

Like Example 11, the sample was measured and it was shown in Tables 6 and 7 (as for the numerical value in Table 6 and 7, the upper row shows light quantity, and the lower berth is a relative value of each light quantity when light quantity of the healthy person pooled serum is set to 1.0.).

In a cancer patient, it turns out that measurement light quantity is higher than the light quantity of the healthy person pooled serum, and a light quantity ratio (value which \*\*(ed) each measurement light quantity with the measurement light quantity of the healthy person pooled serum for the numerical value of the lower berth in front) is large. In patient's serum, even if reactivity may be low to an individual GST fusion protein, by combining two or more GST fusion proteins shows that sensitivity improves. A light quantity ratio has a high combination which includes all the fields of an E1A coupling region especially, and sensitivity is improving.

[0075]

[Table 6]

		GST融合蛋白質	測定発光量(cps)			
			健常人プール 血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
実 施 例	13	GST8	3201 1.0	4330 1.4	5442 1.7	6082 1.6
	14	GST9	3411 1.0	8185 2.4	10262 3.0	13640 4.0
	15	GST10	3336 1.0	8919 2.7	22212 6.7	26301 7.9
	16	GST11	3405 1.0	9773 2.9	19507 5.7	24883 7.3
	17	GST12	3331 1.0	4390 1.3	4434 1.3	7317 2.2
	18	GST13	3189 1.0	5829 1.8	5582 1.8	6060 1.9
	19	GST14	3203 1.0	11285 3.5	18528 5.8	26060 8.2
	20	GST15	3614 1.0	13349 3.7	24366 6.7	29314 8.1

[0076]

[Table 7]

		GST融合蛋白質	測定発光量(cps)			
			健常人プール 血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
実 施 例	21	GST9,GST10,GST11, GST8,GST12	3133 1.0	14235 4.6	19163 6.3	23806 7.6
	22	GST9,GST10,GST11, GST8,GST7	3129 1.0	14460 4.6	21904 7.0	22994 7.3
	23	GST9,GST10,GST11, GST2,GST12	3246 1.0	20229 6.2	30087 9.3	38346 11.8
	24	GST9,GST10,GST11, GST2,GST7	3097 1.0	21856 7.1	30102 9.7	32271 10.4
	25	GST9,GST10,GST11, GST13,GST12	3044 1.0	15905 5.2	19179 6.3	20167 6.6
	26	GST14,GST15,GST8, GST12	3486 1.0	17081 4.9	20366 5.8	21545 6.2
	27	GST14,GST15,GST2 GST12	3502 1.0	20167 5.8	29456 8.4	39919 11.4
	28	GST14,GST15, GST13,GST12	3017 1.0	17148 5.7	21650 7.2	28427 9.4

[0077]

<Comparative example 2>

The sample was measured like the comparative example 1 except having changed GST1-GST7 which were created in the examples 1-7 of creation into GST 8-15 produced in the examples 8-15 of creation. and -- comparing with the band (it is hardly generated or is very weak) in the case of a healthy person Boolean blood serum -- the case of the same grade as a healthy person Boolean blood serum - and the case where it is slightly strong -- \*\* and the case where it is strong -- + -- a table -- in the bottom, the result was shown in Table 8. Even when there was an S/N difference clearly in Example 29, in the comparative example 2, there was a case

where it became – or \*\* judging. It was subjective judgment by viewing, and it was so delicate that the judgment of the comparative example 2 had a possibility that a result might change with judgment persons. On the other hand, since the method of this invention can be measured clearly as a numerical value as Example 29 showed, such problems do not exist.

[0078]

[Table 8]

GST 融合蛋白	測定発光量(cps)		
	患者1血清	患者2血清	患者3血清
GST8	—	±	±
GST9	—	+	±
GST10	+	+	+
GST11	±	±	+
GST12	—	—	±
GST13	±	±	±
GST14	+	+	+
GST15	±	+	+

[Brief Description of the Drawings]

[0079]

[Drawing 1]It is the graph which showed distribution of the light quantity measured about 120 healthy person volunteers' blood serum using the GST fusion protein joint bead (reagent 10 for immunoassay of this invention) (example 12).

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-264294

(P2004-264294A)

(43) 公開日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

GO1N 33/53

GO1N 33/53 ZNAN

4B024

GO1N 33/543

GO1N 33/543 545A

// C12N 15/09

GO1N 33/543 575

C12N 15/00 A

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号

特願2004-22138 (P2004-22138)

(22) 出願日

平成16年1月29日 (2004.1.29)

(31) 優先権主張番号

特願2003-32806 (P2003-32806)

(32) 優先日

平成15年2月10日 (2003.2.10)

(33) 優先権主張国

日本国 (JP)

(71) 出願人 000002288

三洋化成工業株式会社

京都府京都市東山区一橋野本町11番地の

1

(72) 発明者 國近 誠

京都市東山区一橋野本町11番地の1 三

洋化成工業株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA10 BA31 CA04 DA06  
EA04 HA01

(54) 【発明の名称】 RB 1 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬

(57) 【要約】

【課題】 RB 1 遺伝子産物に対する自己抗体を簡便かつ高感度で再現よく検出することができる免疫測定用試薬を提供すること。

【解決手段】 RB 1 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、配列番号(1)のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質(P)と水不溶性担体(B)とが結合されてなることを特徴とする免疫測定用試薬を用いる。アミノ酸配列が、配列番号(2)のアミノ酸配列で表されるアデノウイルスE1 A結合領域に含まれるアミノ酸配列であることが好ましい。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

R B 1 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、配列番号(1)のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質(P)と水不溶性担体(B)とが結合されてなることを特徴とする免疫測定用試薬。

**【請求項2】**

アミノ酸配列が、配列番号(2)のアミノ酸配列で表されるアデノウイルスE 1 A結合領域に含まれるアミノ酸配列である請求項1記載の免疫測定用試薬。

**【請求項3】**

請求項1又は2に記載の試薬と、抗ヒトイムノグロブリン抗体を含有してなる免疫測定用試薬キット。

**【請求項4】**

抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識されてなる請求項3記載の試薬キット。

**【請求項5】**

標識化合物が酵素である請求項4記載の試薬キット。

**【請求項6】**

R B 1 遺伝子産物に対する自己抗体の免疫測定方法であって、請求項4又は5に記載の試薬キットをサンドイッチ法に適用し、標識化合物を定量することにより、検体中のR B 1 遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断する工程を含む免疫測定方法。

**【請求項7】**

化学発光酵素免疫測定法による請求項6記載の免疫測定方法。

**【請求項8】**

検体中のR B 1 遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断する工程において、検体として血液を用い、この検体に対する抗ヒトイムノグロブリン量と、複数の健常人の血液に対する抗ヒトイムノグロブリン量から設定される基準値とを比較することを含む請求項7又は8に記載の免疫測定方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、R B 1 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬、これを含有する免疫測定用試薬キット及び抗R B 1 遺伝子産物に対する自己抗体の免疫測定方法に関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

R B 1 遺伝子は、分子量約110キロダルトンの蛋白質（以下、R B 1 遺伝子産物）をコードする癌抑制遺伝子である。種々のヒト癌において、R B 1 遺伝子に高頻度に欠失と点突然変異等が起こることが知られている（非特許文献1及び2）。一方、肺癌患者においては、血中にR B 1 遺伝子産物と反応する自己抗体が出現することがウエスタンプロット法で認められている（非特許文献3）。

**【0003】**

【非特許文献1】サイエンス（S c i e n c e），243，937頁，1989年

【非特許文献2】オンコジーン（O n c o g e n e），8，1913頁，1993年

【非特許文献3】インターナショナル ジャーナル オブ オンコロジー（I n t . J . O n c o l o g y），19，1035頁，2001年

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

従来、R B 1 遺伝子産物に対する自己抗体はウエスタンプロット法によりその存在が確認されていた。ウエスタンプロット法は、電気泳動又はブロッティング等の煩雑かつ長時間の操作が必要であり、多数の検体を測定する場合、特に臨床検査薬等への適応は困難で

ある。又、ウエスタンプロット法は感度及び再現性等に問題がある。すなわち、本発明の目的は、RB1遺伝子産物に対する自己抗体を簡便かつ高感度で再現性よく検出することができる免疫測定用試薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記目的を達成するために銳意研究を行った結果、本発明者らは、RB1遺伝子産物に対する自己抗体を簡便かつ高感度で再現性良く検出できることを見いだし、本発明に到達した。すなわち、本発明の免疫測定試薬の特徴は、RB1遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、配列番号(1)のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質と水不溶性担体とが結合されてなる点を要旨とする。

【発明の効果】

【0006】

本発明のRB1遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬は、非特異的反応が少なく、感度及び特異性に極めて優れている。すなわち、自己抗体を保有しない健常人からの検体の測定値と自己抗体を保有する癌患者からの検体の測定値との差が充分に大きく（高感度）、また自己抗体を保有しない健常人の検体に対して非特異的反応が極めて少ないので高精度の測定ができる。また、簡便に測定することができるため、数多くの検体を短時間に容易に測定することができる。すなわち、本発明の免疫測定用試薬は、RB1遺伝子産物に対する自己抗体を簡便かつ高感度で再現よく検出することができる。従って、本発明の測定試薬、測定試薬キット及び測定法を用いると、極めて迅速かつ正確な癌の診断ができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

RB1遺伝子からの発現産物であるRB1遺伝子産物は、約110キロダルトンの蛋白質（配列番号(1)のアミノ酸配列からなるポリペプチド）である。

【0008】

配列番号(1)のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質(P)としては、配列番号(1)又は配列番号(1)の一部のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質(P1, P2)等が使用できる。配列番号(1)のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質(P1)は調製が難しく、配列番号(1)の一部のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質(P2)を使用することが好ましい。

【0009】

蛋白質(P2)としては、配列番号(1)のアミノ酸配列をアミノ酸20～600個、好ましくは50～500個、さらに好ましくは100～360個となるように分割した断片（アミノ酸配列）を構成単位としてなる蛋白質等が含まれ、例えば、配列番号(2)（アデノウイルスE1A結合領域）、及び(3)～(19)からなる群より選ばれる配列番号のアミノ酸配列を構成単位とする蛋白質等が挙げられる。これらのうち、配列番号(2)、(3)、(5)、(6)、(7)、(9)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(17)又は(18)のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質が好ましく、さらに好ましくは配列番号(2)、(3)、(5)、(6)、(7)、(9)、(15)、(17)又は(18)のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質である。

【0010】

蛋白質(P)のアミノ酸の個数が20～100個（より好ましくは20～50個）で構成されている蛋白質である場合、蛋白質(P)は、アミノ酸配列のみから構成されていてもよく、さらにN末端及び/又はC末端がビオチン、チオグリコール酸、及び/又はリンカーリして用いるアミノ酸（システイン、リジン、チロシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸等）等で修飾されていてもよい。また、さらにN末端が無水酢酸又はN-アセチルイミダゾール等でアセチル化されていてもよく、C末端が水溶性カルボジイミド（例えば、1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩）又はイソオキサツリ

ウム（例えば、N-メチル-5-フェニルイソオキサゾリウムフルオロボレート）等でアミド化されていてもよい。また、これらの修飾は組み合わせて用いることもできる。N末端及び／又はC末端がアミノ酸で修飾されている場合、このアミノ酸の個数は、N末端又はC末端当たり、1～5が好ましく、さらに好ましくは1～3、特に好ましくは1～2である。N末端及び／又はC末端がビオチン及び／又はチオグリコール酸で修飾されている場合、ビオチン又はチオグリコール酸の個数は蛋白質（P）1分子当たり、1～5が好ましく、さらに好ましくは1～3、特に好ましくは1～2である。これらのうち、ビオチン又はチオグリコール酸で修飾されていることが好ましく、蛋白質（P）と水不溶性担体（B）とを結合する場合の簡便性等の観点から、さらに好ましくはN末端及び／又はC末端がビオチンで修飾されていることである。

#### 【0011】

蛋白質（P）のアミノ酸の個数が100個以上の場合、蛋白質（P）は配列番号（1）～（19）のアミノ酸配列のみから構成されていてもよく、上述の修飾をされていてもよく、蛋白質発現用ベクターから発現した蛋白質を含んでいてもよい。蛋白質発現用ベクターから発現した蛋白質としては、グルタチオントランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ（例えば、ヒスチジンが6個結合したペプチド）及びプロテインAのZZ領域部分の蛋白質等が挙げられる。これらのうち好ましいのは、蛋白質発現用ベクターから発現した蛋白質であり、より好ましいのはグルタチオントランスフェラーゼ及びプロテインAのZZ領域部分の蛋白質である。

#### 【0012】

蛋白質（P）は、遺伝子組み換え等で作成した融合蛋白質であってもよく、例えば配列番号（1）～（19）のいずれかのアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドを、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）と融合した蛋白質等が含まれる。蛋白質（P）が、100個以上のアミノ酸配列を構成単位としてなる場合、調製等の観点から融合蛋白質が好ましい。

#### 【0013】

蛋白質（P）は、従来公知のペプチド合成法、又は遺伝子組み換え法等で作成できる。ペプチド合成法によるとアミノ酸の個数が20個を越えると蛋白質（P）の合成が極めて困難であるのに対して、遺伝子組み換え法であるとそれが容易であるため、調製の容易性等の観点から、遺伝子組み換え法が好ましい。

#### 【0014】

ペプチド合成法は、溶液中でも、あるいは固体支持体上でも達成できるが固相支持体を用いた固相合成法が好ましく、さらに好ましくは自動ペプチド合成機を用いた固相合成法である。ペプチド合成法は、一般に、t-ブチルオキシカルボニル（BOC基）又は9-フルオレニルメトキシカルボニル（FMOC基）で保護された活性化アミノ酸を使用する。この他、具体的な合成操作、側鎖保護の種類、および切断法等は、例えば、ソリッドフェーズペプタイドシンセシス第2版、ピースケミカル社、1984年（Stewart及びYoung, "Solid Phase Peptide Synthesis", 第2版, Pierce Chemical Company, 1984）、及びソリッドフェーズペプタイドシンセシス、アイアールエル社、1989年（Atherton及びSheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL Press, 1989）に詳細に記述されている。

#### 【0015】

遺伝子組み換え法としては、ヒト細胞、例えばヒト血管内皮細胞又はヒト線維芽細胞等から抽出したmRNAから、目的とするアミノ酸配列に対応するプライマーを用いてcDNAを作製し、これをPCR法（ポリメラーゼチェーンリアクション法）によって増幅した後制限酵素で切断し、この断片をベクターに組み込み、得られた発現ベクターで大腸菌等の宿主を形質転換し、必要あれば誘導処理した後、宿主を培養し、菌体溶解物から目的とする融合蛋白質を抽出・精製する。このようにして、蛋白質（P）を含む融合蛋白質が作成できる（例えば、生化学実験法45「組み換えタンパク質生産法」、学会出版センター社、2001年）。以上その他に、RB1遺伝子アミノ酸配列から目的のアミノ酸配列に

該当する遺伝子をDNA合成機で合成した後、その遺伝子をベクターに組み込み発現させることにより、蛋白質(P)を作成できる。

【0016】

本発明の免疫測定用試薬は、このような蛋白質(P)の少なくとも1種を含んでいればよいが、2種以上の蛋白質(P)を含んでいることが、自己抗体との反応性(特異性及び感度)がより高くなる点で好ましい。なお、アミノ酸配列(1)を構成単位としてなる蛋白質であっても、他の種類の蛋白質を含んでいることが好ましい。さらに好ましくは配列番号(2)のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質に加えて、アミノ酸配列(1)のN末端領域(配列番号(3)、(9)又は(15)のアミノ酸配列等)を構成単位としてなる蛋白質及び/又は配列番号(1)のC末端領域(配列番号(8)、(14)又は(19)のアミノ酸配列等)を構成単位としてなる蛋白質を含むことである。最も好ましくは、配列番号(2)のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質、配列番号(1)のN末端領域を構成単位としてなる蛋白質及び配列番号(1)のC末端領域を構成単位としてなる蛋白質を含むことである。

【0017】

本発明の免疫測定用試薬の好ましい蛋白質の組合せ例としては、例えば、次の組合せが例示できる。なお、カッコ内の数字は、配列番号に対応しており、その配列番号のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質を表す。すなわち、(2)+(3)は、配列番号(2)のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質と配列番号(3)のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質との組合せを表す。

【0018】

すなわち、(5)+(6)+(7)、(17)+(18)、(5)+(6)+(18)  
、(5)+(6)+(13)、(5)+(12)+(7)、(5)+(12)+(18)  
、(5)+(12)+(13)、(11)+(6)+(7)、(11)+(6)+(18)  
、(11)+(6)+(13)、(11)+(12)+(7)、(11)+(12)+  
(18)、(17)+(6)+(7)、(17)+(6)+(13)、(17)+(12)  
+(7)、(17)+(12)+(13)、(2)+(3)、(2)+(9)、(2)  
+(15)、(2)+(8)、(2)+(14)、(2)+(19)、(2)+(3)+  
(8)、(2)+(3)+(14)、(2)+(3)+(19)、(2)+(9)+(8)  
、(2)+(9)+(14)、(2)+(9)+(19)、(2)+(15)+(8)  
、(2)+(15)+(14)、(2)+(15)+(19)、(5)+(6)+(7)  
+(3)、(5)+(6)+(7)+(9)、(5)+(6)+(7)+(15)、(5)  
+(6)+(7)+(8)、(5)+(6)+(7)+(14)、(5)+(6)+(7)+  
(19)、(5)+(6)+(7)+(3)+(8)、(5)+(6)+(7)+  
(3)+(14)、(5)+(6)+(7)+(3)+(19)、(5)+(6)+(7)  
+(9)+(8)、(5)+(6)+(7)+(9)+(14)、(5)+(6)+(7)  
+(9)+(19)、(5)+(6)+(7)+(15)+(8)、(5)+(6)  
+(7)+(15)+(14)、(5)+(6)+(7)+(15)+(19)、(9)  
+(11)+(12)+(13)+(14)、(11)+(12)+(13)+(17)  
+(18)+(3)、(17)+(18)+(9)、(17)+(18)+(15)、(17)  
+(18)+(8)、(17)+(18)+(14)、(17)+(18)+(1)  
9)、(17)+(18)+(3)+(8)、(17)+(18)+(3)+(14)、  
(17)+(18)+(3)+(19)、(17)+(18)+(9)+(8)、(17)  
+(18)+(9)+(14)、(17)+(18)+(9)+(19)、(17)+  
(18)+(15)+(8)、(17)+(18)+(15)+(14)及び(17)+  
(18)+(15)+(19)である。

【0019】

これらのうち、(2)+(3)+(14)、(2)+(3)+(19)、(2)+(9)  
+(8)、(2)+(9)+(14)、(2)+(9)+(19)、(2)+(15)  
+(8)、(2)+(15)+(14)、(2)+(15)+(19)、(5)+(6)

+ ( 7 ) + ( 3 ) + ( 8 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 3 ) + ( 14 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 3 ) + ( 19 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 9 ) + ( 8 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 9 ) + ( 14 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 9 ) + ( 19 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 15 ) + ( 8 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 15 ) + ( 14 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 15 ) + ( 19 ) 、 ( 9 ) + ( 11 ) + ( 12 ) + ( 13 ) + ( 14 ) 、 ( 11 ) + ( 12 ) + ( 13 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 3 ) + ( 8 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 3 ) + ( 19 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 9 ) + ( 8 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 9 ) + ( 14 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 9 ) + ( 19 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 15 ) + ( 8 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 15 ) + ( 14 ) 、 及び ( 17 ) + ( 18 ) + ( 15 ) + ( 19 ) が好ましく、さらに好ましくは ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 3 ) + ( 8 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 3 ) + ( 14 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 3 ) + ( 19 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 9 ) + ( 14 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 9 ) + ( 19 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 15 ) + ( 8 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 15 ) + ( 14 ) 、 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 7 ) + ( 15 ) + ( 19 ) 、 ( 9 ) + ( 11 ) + ( 12 ) + ( 13 ) + ( 14 ) 、 ( 11 ) + ( 12 ) + ( 13 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 3 ) + ( 8 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 3 ) + ( 19 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 9 ) + ( 8 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 9 ) + ( 14 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 9 ) + ( 19 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 15 ) + ( 8 ) 、 ( 17 ) + ( 18 ) + ( 15 ) + ( 14 ) 、 及び ( 17 ) + ( 18 ) + ( 15 ) + ( 19 ) である。

#### 【0020】

蛋白質 ( P ) は、これ自体で免疫凝集法等の免疫測定用試薬として用いることができるが、本発明においては、蛋白質 ( P ) が水不溶性担体 ( B ) と結合したかたちで免疫用試薬に含まれる。なお、水不溶性担体の水不溶性とは、1～50℃のいずれの温度においても、水に対する溶解度が0.01g／水100g以下であることを意味し、担体とは1～50℃のいずれの温度においても固体（ゲルを含む）であってRB1遺伝子産物と結合できる物質を意味する。水不溶性担体 ( B ) としては、特開平2-205774号公報に記載の担体等が使用でき、無機物及び有機物等が使用でき、例えば、セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリウレタン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリエステル、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、絹、フィブロイン、リグニン、ヘミセルロース、キチン、エボナイト、ゴム、ガラス、石英、シリコン及びセラミックス等が挙げられる。これらのうち、ポリスチレン、ガラス、石英及びシリコンが好ましく、さらに好ましくはポリスチレン及びガラス、特に好ましくはガラスである。

#### 【0021】

水不溶性担体 ( B ) の形状は、使用する目的に合わせて自由に決定でき、真球状や円盤状のビーズ、板状や棒状のスティック、試験管、及び不織布やフィルターのストリップ（短冊状の細片）、微粒子等が挙げられる。これらのうち、ビーズ及び微粒子が好ましく、さらに好ましくは真球状のビーズである。

#### 【0022】

水不溶性担体 ( B ) の大きさは、使用する目的に合わせて自由に決定できるが、通常は内径4～10mm、深さ10～20mm程度の円柱形反応容器（ビーカー等）に投入できる大きさである（水不溶性担体が試験管の場合を除く。）。真球状ビーズの場合、直径 ( mm ) は1～10が好ましく、さらに好ましくは2～8、特に好ましくは3～7である。円盤状ビーズの場合、直径 ( mm ) は1～10が好ましく、さらに好ましくは2～8、特に好ましくは3～7であり、厚さは ( mm ) は0.1～5が好ましく、さらに好ましくは0.2～2、特に好ましくは0.3～1である。スティックの場合、長さ ( mm ) は2～10が好ましく、さらに好ましくは3～8、特に好ましくは4～7である。また、スティックの断面積 ( mm<sup>2</sup> ) は1～25が好ましく、さらに好ましくは2～16、特に好ましくは3～9である。なお、断面積とは、長軸方向に対して垂直に切断した際の切断部分の断面積を意味する。試験管の場合、長さ ( mm ) は5～100が好ましく、さらに好まし

くは8~80、特に好ましくは10~20である。また、試験管の内径 (mm) は、5~20が好ましく、さらに好ましくは6~16、特に好ましくは8~12である。ストリップの場合、長さ (mm) は、5~100が好ましく、さらに好ましくは10~80、特に好ましくは10~50である。また、ストリップの幅 (mm) は、1~20が好ましく、さらに好ましくは2~16、特に好ましくは3~10である。厚さは (mm) は0.1~2が好ましく、さらに好ましくは0.1~0.5である。不織布やフィルターの平均孔径 ( $\mu\text{m}$ ) は、0.1~10が好ましく、さらに好ましくは0.3~5である。微粒子の場合、平均粒子径 ( $\mu\text{m}$ ) は0.01~200が好ましく、さらに好ましくは0.1~50、特に好ましくは0.2~10である。平均粒子径は、透過型電子顕微鏡法、光学顕微鏡による整列測定法等で測定できる。

## 【0023】

蛋白質 (P) と水不溶性担体 (B) とを結合する方法としては、化学的に結合する方法及び物理吸着により結合する方法等の従来公知の方法等で行うことができる。化学的に結合する方法としては、水不溶性担体 (B) の表面に導入されたアミノ基及び/又はスルフヒドリル基等の官能基と、蛋白質 (P) のアミノ基及び/又はスルフヒドリル基等の官能基とを結合剤 (グルタルアルデヒド、サクシンアルデヒド、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロサクシンイミドエステル及びo-フェニレンビスマレイミド等) で架橋する方法 (米国特許第4280992号明細書及び同第3652761号明細書等) 等が挙げられる。物理吸着により結合する方法としては、水不溶性担体 (B) がポリスチレンの場合、蛋白質 (P) の0.001~0.04% (W/V) 炭酸緩衝水溶液 (pH 9.0) に水不溶性担体を適当時間浸漬する方法 (バイオシム・バイオフィズ・アクタ、251巻、427頁、1971年) 等が挙げられる。この方法は、担体がポリスチレン以外の物質、例えばポリプロピレン、シリコン、ガラス及びセルロース等にも適用できる。また、特異的結合物質 (例えば、抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖、相補的遺伝子鎖等) を利用して間接的に、蛋白質 (P) と水不溶性担体 (B) とを結合することもできる。例えば、蛋白質 (P) をビオチンで修飾し、アビジンを結合した水不溶性担体と反応することにより、蛋白質 (P) を水不溶性担体 (B) に結合できる。アビジンとしては、卵白由来アビジン及びストレプトアビジン等が使用でき、ストレプトアビジンが好ましい。これら特異的結合物質のうち抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖については、[生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」、東京化学同人社、1989年]に記載のもの、相補的な遺伝子としては公開特許公報平6-186232号に記載の相補的な遺伝子、例えばポリデオキシアデニル酸とポリチミジル酸の組み合わせ等が挙げられる。

## 【0024】

これらのうち、蛋白質 (P) のアミノ酸個数が20~100の場合、特異的結合物質を用いる方法が好ましく用いられ、特異的結合物質を用いる方法のうち、アビジン-ビオチン結合を利用した方法が特に好ましい。蛋白質 (P) のアミノ酸個数が100以上の場合は、化学的に結合する方法及び物理吸着による方法が好ましく、最も好ましくは化学的に結合する方法である。なお、アミノ酸個数20~100個の蛋白質と、アミノ酸個数100個以上の蛋白質とを結合する場合、例えば、アビチンとアミノ酸個数100個以上の蛋白質を混合して、水不溶性担体 (B) と結合させた後、ビオチンで修飾した蛋白質と反応させる。

## 【0025】

本発明の免疫測定用試薬は、適当な緩衝液に浸漬した状態でもよいが、蛋白質 (P) と水不溶性担体 (B) とを結合した後、糖類及び/又は蛋白質でコーティングし乾燥した状態が好ましい。緩衝液としては、リン酸緩衝液及びグッド (Good) の緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及び/又は界面活性剤等を含有していてもよい。蛋白としては、アルブミン (牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等)、抗体 (正常ウサギIgG及び正常マウスIgG等の蛋白質 (P) との結合性がない抗体) 及びゼラチン等が挙げられる。塩としては、

塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、ソルビタンラウリン酸モノエステルエチレンオキシド付加物（商品名：ツイーン20及びツイーン40、ICIアメリカ社）等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。コーティング・乾燥方法としては、少なくとも糖類を含有する溶液中に浸漬したのち乾燥させる方法（特開平09-318628号公報及び特公平5-41946号公報）等が挙げられる。

糖類としては、二糖類及び单糖類が好ましく、二糖類としては、麦芽糖、セロビオース、ゲンチオビオース、メリビオース、ショ糖、ラクトース及びイソサッカロース等が挙げられ、单糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、アラビノース及びキシリトース等が挙げられる。これらのうち、ラクトース、ショ糖、グルコース及びフルクトースが好ましく、さらに好ましくはラクトース及びショ糖、特に好ましくはショ糖である。コーティングするとき、コーティング量（糖類などの含有量）、糖類などを含む溶液（コーティング液）の濃度、及び溶液の種類等は、公知の範囲でよく、例えば、特開平09-318628号公報及び特公平5-41946号公報等に記載されている。

#### 【0026】

本発明の免疫測定用試薬キットは、本発明の免疫測定用試薬と共に、抗ヒトイムノグロブリン抗体とを含有していることが好ましい。抗ヒトイムノグロブリン抗体は、従来公知の方法で作成されたものが使用できる。例えば、ヒトイムノグロブリンを適当な動物（例えば、マウス、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ等）に免疫し、得られた抗血清から塩析、イオン交換カラムクロマトグラフィー等で抗体を精製して作成できる。抗ヒトイムノグロブリン抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、また、(F<sub>a</sub>b')<sup>2</sup>、F<sub>a</sub>b'等の抗体断片でもよい。なお、ヒトイムノグロブリンとは、IgG、IgA、IgM等の全てのイムノグロブリンを含むが、通常はIgG及びIgMであり、主にIgGである。

#### 【0027】

抗ヒトイムノグロブリン抗体は、標識されていなくてもよいが、感度、測定の簡便性等の点から標識化合物で標識されていることが好ましい。抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識されていない場合、抗ヒトグロブリン抗体を認識する抗体（例えば抗ヒトイムノグロブリン抗体がマウスのIgGである場合、ウサギで作成した抗マウスIgG抗体）を標識した試薬等が用いられる。標識化合物としては従来公知のものが使用でき、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質及び酵素等が用いられる。アイソトープとしては、<sup>125</sup>I等が挙げられ、蛍光物質としてはユーロピウム錯体等が挙げられ、発光物質としてはN-メチルアクリジウムエステル等が挙げられ、酵素としては西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ等が挙げられる。これらの標識化合物のうち、酵素が好ましく、さらに好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ、特に好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼである。

#### 【0028】

標識化合物を抗ヒトイムノグロブリン抗体に標識する方法は従来公知の方法等が適用でき、「続生化学実験講座5 免疫生化学実験法」（日本生化学会編、東京化学同人、1986年発行、102～112頁に記載の方法等が用いられ、例えば、次の（1）～（4）の方法等が適用できる。

- (1) 標識化合物がアイソトープの場合、クロラミンTを酸化剤として用いて放射性ヨウ素を抗ヒトイムノグロブリン抗体のチロシン残基に導入する方法。
- (2) 標識化合物が蛍光物質の場合、フルオレセインイソチオシアネートを緩衝液中で抗ヒトイムノグロブリン抗体に反応させ、抗ヒトイムノグロブリン抗体のリシン残基に結合させる方法。
- (3) 標識物質が発光物質の場合、商品名「アクリジニウム誘導体-I」（同人化学研究所社製）を緩衝液中で抗ヒトイムノグロブリン抗体に反応させ、抗ヒトイムノグロブリン抗体のアミノ基に結合させる方法。

(4) 標識物質が酵素の場合、酵素の持つアミノ基と抗ヒトイムノグロブリン抗体の持つチオール基をN-スクシンイミジル-6-マレイドヘキサノエート等の二架橋性試薬で結合する方法。

【0029】

本発明の免疫測定用試薬キットには、本発明の免疫測定用試薬を含めば、試薬の剤型及び試薬キットの構成等に制限はない。すなわち本発明の試薬キットは、ラテックス凝集法及びラテックス比濁法等のホモジニアス免疫測定法にも、ヘテロジニアス免疫測定法にも適用できる。これらのうち、測定感度の点で、ヘテロジニアス免疫測定方法が好ましく、標識化合物を標識され抗ヒトイムノグロブリン抗体を含むヘテロジニアスなサンドイッチ免疫測定法用の試薬キットが最も好ましい。すなわち、本発明の免疫測定用試薬と検体とを反応させるとRB1遺伝子産物に対する自己抗体のみが特異的に蛋白質(P)と結合する。そこで、抗ヒトイムノグロブリン抗体を加えると、この抗体は自己抗体と結合し、免疫複合体「蛋白質(P)-自己抗体-抗ヒトイムノグロブリン抗体」を形成する。この免疫複合体中の抗ヒトイムノグロブリン抗体を定量することにより自己抗体量を定量できる。抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識している場合、抗ヒトイムノグロブリン抗体量は標識化合物の量を測定することにより定量することができる。

【0030】

標識化合物の測定は、標識化合物の種類により従来公知の方法等で実施できる。標識化合物が蛍光物質の場合、例えば適当な波長の励起光の照射によって生じる蛍光量を光電子増倍管により定量する。標識化合物が化学発光物質の場合、例えばアクリジニウムエステルではアルカリ溶液を加えることにより生じる発光量を光電子増倍管により定量する。

【0031】

標識化合物が酵素の場合、適当な基質を反応させることにより酵素活性を吸光度(吸光度測定法)、蛍光量(蛍光量測定法)又は発光量(化学発光量測定法)として測定できる。例えば、酵素がペルオキシダーゼの場合、基質としては2,2'-アジノーピス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)二アンモニウム(ABTS)(吸光度測定法)及びルミノール/過酸化物(化学発光量測定法)等を選択できる。酵素がアルカリ fosfotaurine の場合、基質としてはp-ニトロフェニルfosfate(吸光度測定法)、4-メチルウンベリフェリルリン酸(4-MUP)(蛍光量測定法)及び3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3' ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・二ナトリウム(AMPPD)(化学発光量測定法)等を選択できる。吸光度は分光光度計、蛍光量及び化学発光量は光電子増倍管により定量される。これらのうち、化学発光量測定法が好ましく(すなわち、本発明の試薬キットを用いて自己抗体を定量する方法としては化学発光酵素免疫測定法が好ましい。)、さらに好ましくはペルオキシダーゼとルミノール/過酸化物との組合せ又はアルカリ fosfotaurine とAMPPDとの組み合わせによる化学発光量測定法である。

【0032】

ルミノールとしては、ルミノール、イソルミノール、N-アミノヘキシル-N-エチルイソルミノール(AHE I)、N-アミノブチル-N-エチルイソルミノール(ABE I)及びこれらの金属塩等が含まれる。これらの金属塩としては、アルカリ金属(ナトリウム及びカリウム等)塩及びアルカリ土類金属(カルシウム及びマグネシウム等)塩等が使用できる。これらのうち、ルミノール及びルミノールの金属塩が好ましく、さらに好ましくはルミノールの金属塩、特に好ましくはルミノールのナトリウム塩である。過酸化物としては、無機過酸化物及び有機過酸化物のいずれも使用できる。無機過酸化物としては、過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム、過ホウ酸カリウム、過酸化酸、過酸化炭酸、過酸化二炭酸、次亜塩素酸、次亜塩素酸カリウム、亜塩素酸、塩素酸、塩素酸ナトリウム、過塩素酸、過臭素酸、ペルオクソ硫酸及びペルオクソリン酸等が挙げられる。有機過酸化物としては、過酢酸、過プロピオン酸、ジメチルスルホキシド(DMSO)、トリエチルアミノキサイド、メチルジエチルアミノキサイド及び過酸化フタロイル等が挙げられる。これらのうち、保存安定性等の観点から、無機過酸化物が好ましく、さらに好ましくは過酸

化水素である。

【0033】

本発明の免疫測定用試薬キットには、蛋白質（P）と水不溶性担体（B）とが結合してなる試薬（本発明の免疫測定用試薬）に好ましくは抗ヒトイムノグロブリンを含む試薬を加えて、さらに免疫反応用緩衝液、B／F分離用緩衝液及びコントロール試料等を含むことができる。免疫反応用緩衝液及びB／F分離用緩衝液としては従来免疫測定に使用される緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及び／又は界面活性剤等を含有するリン酸緩衝液及びグッド（Good）の緩衝液等が使用できる。蛋白、塩及び界面活性剤としては上記と同じもの等が挙げられる。

【0034】

コントロール試料は、検体にRB1遺伝子産物に対する自己抗体が存在するかを判断するための比較試料として用いるものであり、通常、自己抗体を含まない試料（陰性コントロール）及び自己抗体を含む試料（陽性コントロール）が用意される。陰性コントロールとしては、免疫反応用緩衝液と同様な蛋白等を含有した緩衝液、RB1遺伝子産物に対する自己抗体を保有しないヒトプール血清等が使用できる。陽性コントロールとしては、RB1遺伝子産物に対する自己抗体を保有するヒトプール血清、及びRB1遺伝子産物に対する自己抗体を含む血清を添加した緩衝液（免疫反応用緩衝液と同様な蛋白等を含有）等が使用できる。

【0035】

本発明の免疫測定用試薬キットで測定される検体は、ヒト由来の体液であれば特に限定されず、例えば血液、尿、唾液、リンパ液、胆汁、胃液、膣液等が挙げられ、さらに生体から採取された組織のホモジネート抽出液等も用いることができる。これらのうち、血液及び尿が好ましく、さらに好ましくは血液（全血、血清又は血漿等を含む）である。

【0036】

本発明の試薬キットを用いたRB1遺伝子産物に対する自己抗体を検出する方法（サンドイッチ測定法）の具体例（工程1～6）を以下に示す。

工程1．検体と、蛋白質（P）と水不溶性担体（B）が結合されてなる免疫測定用試薬（本発明の免疫測定用試薬）とを反応させて反応混合物（工程2の複合体1を含む）を得る。

工程2．工程1の反応混合物から未反応物を除き（B／F分離）、複合体1を得る。

工程3．工程2で得られた複合体1と、標識化合物で標識された抗ヒトイムノグロブリノン抗体とを反応させて反応混合物（工程4の複合体2を含む）を得る。

工程4．工程3の反応混合物から未反応物を除き（B／F分離）、複合体2を得る。

工程5．複合体2の標識化合物の量を測定する。

工程6．標識化合物の量を用いて、基準値（陰性コントロール及び／又は陽性コントロール）と比較し、自己抗体の有無を判定する。

【0037】

検体中のRB1遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断する工程（上述の例では工程6）において、検体である血液に対する抗ヒトイムノグロブリン抗体量（抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される）と、複数の健常人の血液での抗ヒトイムノグロブリン量（抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される）から設定される基準値とを比較することにより自己抗体の有無を判定することが好ましい。基準値の設定方法は、例えば「臨床検査薬ガイド1999～2000、p64～71、文光堂（1999）」、「臨床検査データブック1997～1998、p8～13、医学書院（1997）」に記載された方法で行うことができる。すなわち複数の健常人（少なくとも50人以上、好ましくは120人以上）を測定し、標識化合物量を求める（化学発光酵素免疫測定法の場合、発光量となる）。標識化合物量を統計処理（パラメトリック法、ノンパラメトリック法等〔パラメトリック法は母集団が正規分布（べき乗変換しても可）を示す場合に使用し、ノンパラメトリック法は母集団が正規分布しない場合に使用される。〕）し、標本群の95%を含む範囲を求める基準範囲とし、上限を上限基準値

、下限を下限基準値と設定する。従って、上限基準値を越えた検体については自己抗体を有する可能性が高いが、5%の確率で健常人でも越える場合がある。これを防ぐため、通常は上限基準値にさらに係数を乗じ、及び／又は付加したカットオフ値を設定することが行われる。すなわちカットオフ値を超えた検体を自己抗体が有るものとして判定する。カットオフ値の設定は、上限基準値とRB1遺伝子産物に対する自己抗体を有する検体の分布下限の値との関係で設定するが、通常は上限基準値の1.5～3倍程度の値である。

#### 【0038】

上述の陰性コントロール及び陽性コントロールは、設定したカットオフ値を簡易に再現できるように調製したものである。例えば、陰性コントロールの測定値（標識化合物量）の3倍がカットオフ値となる、陰性コントロールと陽性コントロールの平均値がカットオフ値となる等、の設定が可能である。

#### 【実施例】

#### 【0039】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0040】

##### <作成例1> RB1遺伝子産物（GST融合蛋白質）の作製

インターナショナル ジャーナル オブ オンコロジー (Int. J. Oncology), 19, 1035頁, 2001年に記載の方法に準じて、GST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）との融合蛋白質を以下の通り作製した。

#### 【0041】

##### 1. RB1遺伝子の調製

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) (フナコシ社より購入) からRNAを抽出した。抽出は、AGPC (Acetate buffer, Guanidinium thiocyanate, phenol, chloroform) 法を用いて、次のようにして行った。

#### 【0042】

##### (AGPC法試薬の調製)

###### (1) 1M クエン酸ナトリウム (pH 7.0) の調製

クエン酸三ナトリウムの29.4gを蒸留水80mlに溶解した後、クエン酸を加えて、pH 7.0にあわせた後、25°Cで蒸留水を加えて100mlとした。そして、オートクレーブ滅菌 (120°C、20分) してから使用した。

###### (2) D液の調製

GTC (グアニジウムチオシアネート) 236.3g (4M)、ザルコシル (L-L auroyl sarcosine) 2.5g (0.8重量%)、1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 12.5ml (25mM) 及び蒸留水250ml を85°Cで均一溶解した後、室温 (25°C) に戻し、蒸留水で496ml にあわせた。細孔径0.45μm ポトルトップフィルターで沪過して保存した。使用時にこの保存溶液50ml に対して2-メルカプトエタノール360μl (0.1M) を加え、D液とした。

###### (3) 2M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) の調製

酢酸ナトリウム・トリハイドレート27.2gを蒸留水10mlに溶解させた後、酢酸を用いてpH 4.0にあわせ、25°Cで蒸留水を加えて100mlとした。細孔径0.45μm ポトルトップフィルターで沪過して使用した。

#### 【0043】

##### (AGPC法の操作)

(1) チューブにD液0.5mlを加え、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を分散し、細胞を破壊した。

(2) さらに、2M 酢酸ナトリウム50μl、フェノール0.5ml 及びクロロホルム／イソアミルアルコール(体積比4/1)100mlを順次加え、1種類いれるごとに、チューブを2～3回振り、混ぜた。

- (3) 10秒間激しく混ぜた後、15分間氷冷した。
- (4) 遠心加速度10,000Gで10℃、20分間遠心した後、下部に分離した水層を、DNAを含む中間層が混入しないように、別のチューブに分取した。
- (5) 分取した水層に、イソプロパノール0.5mLを加え、-20℃で1時間冷やした。次に、10分間遠心(10,000G、0℃)し、RNAを沈殿させた。
- (6) 沈殿したRNAを0.5mLのD液に再び溶解し、イソプロパノール0.5mLを加え、-20℃で1時間置く。
- (7) 遠心してRNAを沈殿させ、沈殿を80重量%エタノール水溶液1mLで洗い、乾燥させた後、水に溶解する。

#### 【0044】

このようにして抽出したRNAから、商品名「レディートゥーゴウ RT-PCR ビーズ」(Ready-To-Go RT-PCR Beads, アマシャム社)を使用して、cDNAの合成及び増幅を行った。すなわち、レディートゥーゴウ RT-PCR ビーズにRNA及び表1の作成例1記載のアミノ酸配列に対応した3'プライマー溶液を加え、42℃、1時間反応した後、95℃、5分間加温処理し、cDNAを合成した。引き続き、cDNAを含む反応液に5'プライマーを加え、PCR(ポリメラーゼチエーンリアクション)をデナチュレイション反応(95℃、1分)、アニーリング反応(60℃、1分)、伸長反応(72℃、1分)の条件でPCR用サーマルサイクラー(MP PCR サーマルサイクラー、宝酒造製)を用いて30サイクルを行い、増幅されたcDNAを得た。

#### 【0045】

##### 2. 組み換え遺伝子の作成及び発現

得られたcDNAを発現用ベクターpGEX-4T-3(アマシャム社より購入)のBamHI/EcoRI部位にモレキュラークローニング、アラボラトリー マニュアル第2版(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 1, 2nd ed), 1989年記載の方法で組み込んだ。シークエンス法にてcDNAの挿入方向が正しく組み込まれていることを確認した後、大腸菌BL21(DE3), LysS(Novagen社)にトランスフォーム後、0.1mMのイソプロピルチオベータガラクトシド(IPTG)を含む培地にて37℃、2時間誘導をかけた。超音波破碎により調製した大腸菌の細胞ライゼイトより目的の融合蛋白質をグルタチオン結合アフィニティーゲル(商品名:グルタチオンセファロース4B、アマシャム社製)を用いたアフィニティークロマトグラフィー法にて精製(溶出液: 10mMの還元型グルタチオンを含む0.02Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/塩酸緩衝液)し、GST融合蛋白質GST1(配列番号(2)のアミノ酸配列を構成単位としてなる蛋白質)を調製した。

#### 【0046】

##### <作成例2~7>

表1に示した3'プライマー及び5'プライマーを使用した以外は作成例1と同様にして、GST融合蛋白質(GST2~7)を調製した。

#### 【0047】

【表1】

		GST融合蛋白質	構成単位となるアミノ酸配列の配列番号	3'プライマーの塩基配列の配列番号	5'プライマーの塩基配列の配列番号
作成例	1	GST1	(2)	(20)	(21)
	2	GST2	(9)	(22)	(23)
	3	GST3	(10)	(24)	(25)
	4	GST4	(11)	(26)	(27)
	5	GST5	(12)	(28)	(29)
	6	GST6	(13)	(30)	(31)
	7	GST7	(14)	(32)	(33)

## 【0048】

## &lt;実施例1&gt;

## 1. GST1結合ビーズの作成

1重量%γ-アミノプロピルトリエトキシシラン含有アセトン溶液20mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に直径3.2mmのガラスビーズ（イムノケミカル社製）1000個を加え、1時間、25°Cで反応させ、反応残液をアスピレーターで吸引除去した。

次いで脱イオン水20mLを加えて蓋をし、ポリスチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌したのち、液をアスピレーターで吸引除去してガラスビーズを洗浄した。この洗浄操作を3回行った。

次いで、この洗浄後のガラスビーズ1000個を2重量%グルタルアルデヒド含有水溶液20mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、1時間、25°Cで反応させ、反応残液をアスピレーターで吸引除去した。そして、脱イオン水20mLを加えて蓋をし、ポリスチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌したのち、液をアスピレーターで吸引除去してガラスビーズを洗浄した。この洗浄操作を3回行った。

さらにこの洗浄後のガラスビーズ1000個をGST1を20μg/mLの濃度で含む0.02Mリン酸緩衝液(pH8.7)20mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、1時間、25°Cで反応させた。

反応後、GST1含有リン酸緩衝液を除去し、20mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.2)に4°C、8時間浸漬した。その後、緩衝水溶液をアスピレーターで吸引除去し、20mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.2)でビーズを2回洗浄した後、10重量%のショ糖を含むリン酸緩衝液(pH7.2)に30分間浸漬後、リン酸緩衝液をアスピレーターで除き、ビーズをろ紙上に撒き室温(約25°C)で風乾し、GST融合蛋白質結合ビーズ1(本発明の免疫測定用試薬1)を調整し、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵(2~10°C)保存した。

## 【0049】

## 2. 免疫反応用緩衝液の作成

0.02Mのリン酸緩衝液(pH8.0)に、カゼインを3g/L及び塩化ナトリウムを8.5g/Lの濃度になるように添加し、免疫反応用緩衝液を作成した。使用時まで冷蔵(2~10°C)保存した。

## 【0050】

## 3. ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体の作成

抗ヒトイムノグロブリンポリクローナル抗体(ダコジャパン(株)製)及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(東洋紡(株)製)を用い、文献[エス・ヨシタケ、エム・イマガワ、イー・イシカワ、エトール；ジェイ・バイオケム, Vol. 92(1982年) 14]

13-1424頁]に記載の方法でペルオキシダーゼ標識抗 $\beta$ 2-マイクログロブリンポリクローナル抗体[1mg/mLの蛋白質濃度である0.02Mのリン酸緩衝液(pH6.0)の溶液]を調製し、冷凍(-30°C)保存した。

【0051】

4. 酵素標識抗体液の作成

上記で作成した免疫反応緩衝液及びペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いて次の通り酵素標識抗体液を作成した。すなわち、免疫反応用緩衝液100mLにペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を蛋白量で100μg添加し、攪拌混合し、これを酵素標識抗体液とした。

【0052】

5. 過酸化水素液の調製

200μlの35重量%過酸化水素水を脱イオン水1リットルに溶解し、過酸化水素水とした。使用するまで冷蔵(2~10°C)保存した。

【0053】

6. 基質液の調製

ルミノール(東京化成製)0.18g及び4-(シアノメチルチオ)フェノール0.1g(三新化学製)を0.1M(モル/L)、pH8.5のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/塩酸緩衝液1リットルに溶解した。使用するまで遮光、冷蔵(2~10°C)保存した。

【0054】

<実施例2~10>

1. R B 1遺伝子産物(GST融合蛋白質)結合ビーズの作成

GST1に換えて、表2に示したGST融合蛋白質を用いた以外実施例1と同様にして、GST融合蛋白質結合ビーズ2~10(本発明の測定用試薬2~10)を調整し、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵(2~10°C)保存した。

なお、複数のGST融合蛋白質を組み合わせて使用する場合(実施例8~10)、各GST融合蛋白質の量は同じとし、総量が20μg/mLになるようにした。また、免疫反応用緩衝液、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液は、実施例1で作成したもの用いた。

【0055】

<実施例11>

健常人プール血清及び癌患者血清を測定した例である。

1. 検体

健常人ボランティア50名から採取した血清を各0.2mLずつ混合し、健常人プール血清10mLを作成し検体1とした。又、癌患者から得た血清(患者1~3)を各10mLを用意し検体2~4として用いた。

【0056】

2. 免疫反応操作

12×75mm試験管中に、免疫測定用緩衝液300μL、検体1(健常人プール血清)10μL、及びGST融合蛋白質結合ビーズ1個を加え、37°Cで、10分間反応させた。反応残液をアスピレーターで除去した後、生理食塩水2mLを加えビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水2mLを加え同様に洗浄した。次に、酵素標識抗体液300μLを、洗浄後のビーズに加え37°C、10分反応させた。反応液をアスピレーターで除去し、生理食塩水2mLを加えビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水2mLを加え同様に2回洗浄した。洗浄後のビーズについて、次のようにして酵素活性の測定を行った。また、検体2~4についても同様にして酵素活性の測定を行った。

【0057】

3. 酵素活性測定操作

洗浄後のビーズが入った試験管(12×75mm)をアロカ社製ルミネッセンスリーダ

－BLR-201型のサンプルホルダーにセットし、基質液200μL及び過酸化水素水200μLを加え化学発光反応を開始した。発光反応開始40秒後から10秒間の発光量を積算計測し、これを酵素活性を示す発光量とした。

【0058】

#### 4. 測定結果

発光量の測定結果を表2に示した。なお、表2中の数値は、上段が発光量を示し、下段は健常人プール血清の発光量を1.0としたときの各発光量の相対値である。

癌患者では、測定発光量が健常人プール血清の発光量より高く、発光量比（表中下段の数値で、各測定発光量を健常人プール血清の測定発光量で除した値）が大きいことが判る。又、患者血清では個別のGST融合蛋白質に対して反応性が低い場合があつても、複数のGST融合蛋白質を組み合わせることにより感度が向上することが判る。特に、E1A結合領域の全領域を含む組み合わせが発光量比が高く、感度が向上している。

【0059】

【表2】

		GST融合蛋白質	測定発光量(cps)			
			健常人プール血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
実施例	1	GST1	3365 1.0	9686 2.9	19370 5.8	24307 7.2
	2	GST2	3238 1.0	6742 2.1	7164 2.2	7368 2.3
	3	GST3	3418 1.0	4364 1.3	5248 1.5	5926 1.7
	4	GST4	3721 1.0	9597 2.6	16397 4.4	20370 5.5
	5	GST5	3647 1.0	7591 2.1	12760 3.5	24063 6.6
	6	GST6	3367 1.0	10836 3.2	10347 3.1	18062 5.4
	7	GST7	3517 1.0	6928 2.0	9087 2.6	12068 3.4
	8	GST4,GST5,GST6	3449 1.0	11307 3.3	20101 5.8	21302 6.2
	9	GST1,GST2,GST7	3463 1.0	12645 3.7	24378 7.0	32086 9.3
	10	GST4,GST5,GST6, GST2,GST7	3397 1.0	15966 4.7	28301 8.3	26640 7.8

【0060】

#### <比較例1>

本比較例は従来技術による方法で測定を行った例である。

##### 1. GST融合蛋白質のプロッティング

作成例1～7で作成したGST1～GST7の各1μgをファルマシア社製「ファストシステム(Phast System)」を用いてSDSポリアクリラミドゲル電気泳動及びニトロセルロースフィルターへのプロッティングを行った。電気泳動は、ゲルとしてファルマシア社製「ファストゲルホモジニアス(Phast Gel Homogeneous)12.5」、泳動バッファーとしてファルマシア社製「ファストゲルスディエスバッファーストリップ(Phast Gel SDS Buffer Strips)」を用い、温度15℃、電圧250V、泳動2時間で行った。泳動したゲルからGST蛋白質をファルマシア社製「ファストransfer(Phast Transfer)セミドライプロッティング」を用いてニトロセルロースメンブレン(ミリポア社製)にプロッティングした。プロッティングバッファーは、192mMグリシン及び10容量%メタノールを含む25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(pH8.3)を用いた。プロッ

ティングは、温度15°C、電圧20V、泳動30分で行った。

【0061】

2. 検体中の自己抗体の検出

このメンブレンを5重量%脱脂粉乳含有0.02Mリン酸緩衝液(pH7.0)に室温(25°C)で8時間浸した。メンブレンを取り出し、検体1(健常人プール血清)を5重量%脱脂粉乳含有0.02Mリン酸緩衝液(pH7.0)で400倍に希釈した溶液に浸漬し、25°C、3時間反応させた。次いでフィルターを取り出し、0.1%Tween20含有0.02Mリン酸緩衝液(7.0)に25°C、1時間振とうしながら放置した後、液をアスピレーターで除くことによりフィルターを洗浄した。この洗浄を3回実施した。洗浄したフィルターを実施例1で作成した酵素標識抗体液に浸漬し、25°C、1時間反応した。上述の洗浄を同様に6回行った。洗浄したフィルターを50mgの3,3'-ジアミノベンジンを含む100mLの0.05Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/塩酸緩衝液(pH7.6)に浸漬し、25°C、10分反応した。上述の洗浄を5回(ただし放置時間は10分)行った後、フィルターを25°Cで風乾した後、生じた発色バンドを目視で確認した。また、検体2~4(癌患者1~3の血清)についても同様にして、発色バンドを目視確認した。

【0062】

3. 評価

健常人プール血清の場合のバンド(ほとんど生じないか、極弱い)と比較して、健常人プール血清と同じ程度の場合を-、僅かに強い場合を±、強い場合を+で表した結果を表3に示した。実施例11で明らかにS/N差がある場合でも、比較例1では-あるいは±判定となる場合があった。また、比較例1の判定は目視による主観的な判断であり、判定者によって結果が異なる恐れがあるほど微妙なものであった。一方、本発明の方法は、実施例11で示したように数値として明確に測定できるため、こういった問題は無い。

【0063】

【表3】

G S T融合蛋白	測定発光量(cps)		
	患者1血清	患者2血清	患者3血清
GST1	+	+	+
GST2	±	±	±
GST3	-	-	±
GST4	±	+	+
GST5	-	±	+
GST6	±	+	+
GST7	-	±	+

【0064】

<実施例12>

複数の健常人血清を測定して基準値を求め、カットオフ値を設定し、癌患者10名からの血清を測定し、RB1遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断した例である。

【0065】

1. 検体の測定

実施例10で調製したGST融合蛋白質(GST4、GST5、GST6、GST2及びGST7)結合ビーズ10を用いて、実施例11の方法と同様にして、健常人ボランティア120名からの血清検体及び実施例11の検体1(健常人プール血清)を測定した。

健常人ボランティア120名の測定値(発光量)の分布を図1に示した。なお、図の横軸は発光量(cps)であり、点は検体の分布(1点が1検体に対応)を示す。

【0066】

## 2. カットオフ値の設定

健常人ボランティア120名からの血清検体及び検体1の測定値（発光量）を統計処理ソフト「STAT FLEX v. 4.1」（アーテック社製）を用いて分布型を解析した結果、発光量分布は、歪度1.49、尖度4.90であった。なお、この分布は正規分布していなかった。ノンパラメトリック法で95%の信頼区間を求めたところ、基準値は、発光量1606～7547であった。ここで上限発光量の1.5倍の発光量をカットオフ値と設定すると、発光量11321であった。この時、検体1（健常人プール血清）の発光量は3406であり、カットオフ値の1/3.32であった。従って、検体1（健常人プール血清）を、陰性コントロールとして測定した場合、カットオフ値＝「健常人プール血清測定発光量」×3.32と設定された。

【0067】

## 3. 検体の測定

癌患者10名（患者4～13）から採取した血清検体5～14及び陰性コントロールとして実施例11で作成した検体1（健常人プール血清）を測定した。測定は、実施例10のGST融合蛋白質結合ビーズ10を用いて実施例11と同様にして行った。

【0068】

## 4. 判定結果

検体1（健常人プール血清）を陰性コントロールとし、上記2で設定した係数でカットオフ値（「健常人プール血清測定発光量」×係数）を求めた。発光量がカットオフ値以上（カットオフ比1.0以上）の測定値を自己抗体陽性、一方、発光量がカットオフ値未満（カットオフ比1.0未満）の測定値を自己抗体陰性と判断した。これらの結果を表4に示した。

【0069】

【表4】

検体	発光量(cps)	カットオフ比	判定
健常人プール血清	3406	—	—
患者4	23601	2.1	陽性
患者5	15420	1.4	陽性
患者6	21307	1.9	陽性
患者7	7370	0.7	陰性
患者8	20677	1.8	陽性
患者9	9834	0.9	陰性
患者10	29067	2.6	陽性
患者11	196078	17.3	陽性
患者12	21937	1.9	陽性
患者13	41908	3.7	陽性
カットオフ値	11308	1.0	—

【0070】

表4から、癌患者では高頻度（10人中8人）でRB1遺伝子産物に対する自己抗体が陽性と判定された。本発明の方法が、癌の診断に有用である可能性が示された。

【0071】

&lt;作成例8～15&gt;

表5に示した3'プライマー及び5'プライマーを使用した以外は作成例1と同様にして、GST融合蛋白質（GST8～15）を調製した。

【0072】

【表5】

		GST融合蛋白質	構成単位となるアミノ酸配列の配列番号	3' プライマーの塩基配列の配列番号	5' プライマーの塩基配列の配列番号
作成例	8	GST8	(3)	(34)	(23)
	9	GST9	(5)	(35)	(27)
	10	GST10	(6)	(36)	(29)
	11	GST11	(7)	(37)	(31)
	12	GST12	(8)	(32)	(33)
	13	GST13	(15)	(38)	(23)
	14	GST14	(17)	(39)	(21)
	15	GST15	(18)	(40)	(41)

【0073】

&lt;実施例13～28&gt;

## 1. R B 1遺伝子産物（GST融合蛋白質）結合ビーズの作成

G S T 1に換えて、表6又は7に示したG S T融合蛋白質を用いた以外実施例1と同様にして、G S T融合蛋白質結合ビーズ1 1～2 6（本発明の測定用試薬1 1～2 6）を調整し、乾燥剤（シリカゲル）を入れた密閉容器中で冷蔵（2～10℃）保存した。

なお、複数のG S T融合蛋白質を組み合わせて使用する場合（実施例19～26）、各G S T融合蛋白質の量は同じとし、総量が20 μg/mLになるようにした。また、免疫反応用緩衝液、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液は、実施例1で作成したもの用いた。

【0074】

&lt;実施例29&gt;

実施例1 1と同様にして、検体を測定し表6及び7に示した（表6及び7中の数値は、上段が発光量を示し、下段は健常人プール血清の発光量を1.0としたときの各発光量の相対値である。）。

癌患者では、測定発光量が健常人プール血清の発光量より高く、発光量比（表中下段の数値で、各測定発光量を健常人プール血清の測定発光量で除した値）が大きいことが判る。又、患者血清では個別のG S T融合蛋白質に対して反応性が低い場合があっても、複数のG S T融合蛋白質を組み合わせることにより感度が向上することが判る。特に、E 1 A結合領域の全領域を含む組み合わせが発光量比が高く、感度が向上している。

【0075】

【表6】

		G S T融合蛋白質	測定発光量(cps)			
実施例	番号		健常人プール血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
13	GST8		3201 1.0	4330 1.4	5442 1.7	6082 1.6
14	GST9		3411 1.0	8185 2.4	10262 3.0	13640 4.0
15	GST10		3336 1.0	8919 2.7	22212 6.7	26301 7.9
16	GST11		3405 1.0	9773 2.9	19507 5.7	24883 7.3
17	GST12		3331 1.0	4390 1.3	4434 1.3	7317 2.2
18	GST13		3189 1.0	5829 1.8	5582 1.8	6060 1.9
19	GST14		3203 1.0	11285 3.5	18528 5.8	26060 8.2
20	GST15		3614 1.0	13349 3.7	24366 6.7	29314 8.1

【0076】

【表7】

		G S T融合蛋白質	測定発光量(cps)			
実施例	番号		健常人プール血清	患者1血清	患者2血清	患者3血清
21	GST9,GST10,GST11, GST8,GST12		3133 1.0	14235 4.6	19163 6.3	23806 7.6
22	GST9,GST10,GST11, GST8,GST7		3129 1.0	14460 4.6	21904 7.0	22994 7.3
23	GST9,GST10,GST11, GST2,GST12		3246 1.0	20229 6.2	30087 9.3	38346 11.8
24	GST9,GST10,GST11 GST2,GST7		3097 1.0	21856 7.1	30102 9.7	32271 10.4
25	GST9,GST10,GST11, GST13,GST12		3044 1.0	15905 5.2	19179 6.3	20167 6.6
26	GST14,GST15,GST8, GST12		3486 1.0	17081 4.9	20366 5.8	21545 6.2
27	GST14,GST15,GST2 GST12		3502 1.0	20167 5.8	29456 8.4	39919 11.4
28	GST14,GST15, GST13,GST12		3017 1.0	17148 5.7	21650 7.2	28427 9.4

【0077】

## &lt;比較例2&gt;

作成例1～7で作成したG S T 1～G S T 7を作成例8～15で作製したG S T 8～15に変えた以外、比較例1と同様にして検体を測定した。そして、健常人プール血清の場合のバンド（ほとんど生じないか、極弱い）と比較して、健常人プール血清と同じ程度の場合を-、僅かに強い場合を±、強い場合を+で表した結果を表8に示した。実施例29で明らかにS/N差がある場合でも、比較例2では-あるいは±判定となる場合があった。また、比較例2の判定は目視による主観的な判断であり、判定者によって結果が異なる恐れがあるほど微妙なものであった。一方、本発明の方法は、実施例29で示したように数値として明確に測定できるため、こういった問題は無い。

【0078】

【表8】

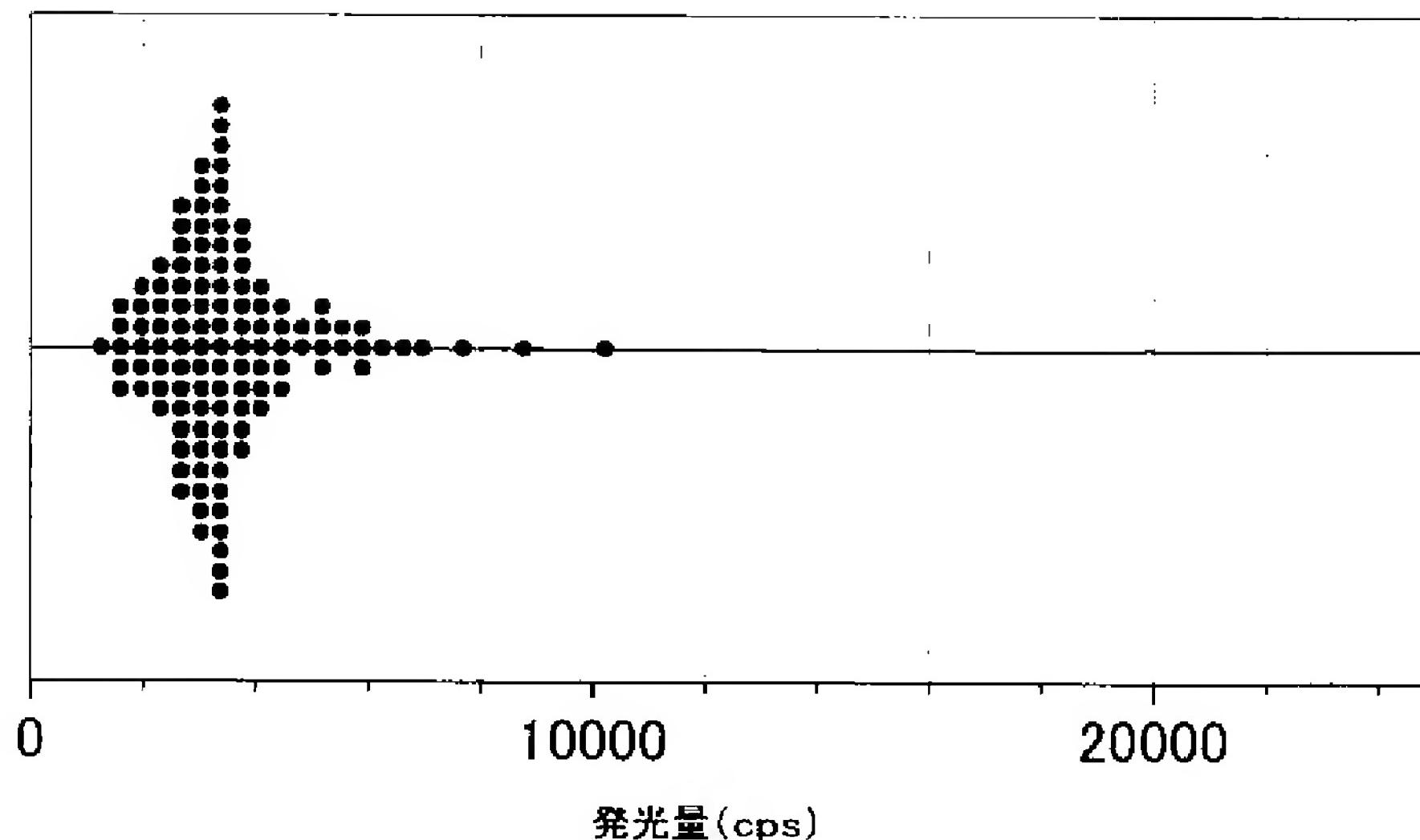
G S T 融合蛋白	測定発光量(cps)		
	患者1血清	患者2血清	患者3血清
GST8	—	±	±
GST9	—	+	±
GST10	+	+	+
GST11	±	±	+
GST12	—	—	±
GST13	±	±	±
GST14	+	+	+
GST15	±	+	+

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】G S T融合蛋白質結合ビーズ（本発明の免疫測定用試薬10）を用いて、健常人ボランティア120名の血清について測定した発光量の分布を示したグラフである（実施例12）。

【図1】



【配列表】

2004264294000001.app